



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 651 946

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 30.06.2009 PCT/EP2009/058188

(87) Fecha y número de publicación internacional: 07.01.2010 WO10000741

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 30.06.2009 E 09772441 (3)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 13.09.2017 EP 2313432

(54) Título: Utilización de péptidos CD31 en el tratamiento de trastornos trombóticos y autoinmunes

(30) Prioridad:

30.06.2008 EP 08305360

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 30.01.2018

(73) Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (100.0%) 101 Rue de Tolbiac 75013 Paris, FR

(72) Inventor/es:

CALIGIURI, GIUSEPPINA y NICOLETTI, ANTONINO

(74) Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

DESCRIPCIÓN

Utilización de péptidos CD31 en el tratamiento de trastornos trombóticos y autoinmunes

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se deriva del descubrimiento de que el dominio extracelular de las proteínas CD31 presentes en los leucocitos de la sangre se pierde y se libera en la circulación como una forma soluble de CD31. La solicitud da a conocer péptidos que corresponden a fragmentos de CD31 que inhiben la respuesta de células T, y a su uso en el tratamiento de trastornos trombóticos y autoinmunes.

ANTECEDENTES

Trastornos trombóticos

15

20

25

10

[0002] En una persona sana, existe un equilibrio homeostático entre las fuerzas procoagulantes (coagulación) y las fuerzas anticoagulantes y fibrinolíticas. Numerosos factores genéticos, adquiridos, y ambientales pueden inclinar la balanza a favor de la coagulación, lo que lleva a la formación patológica de trombos en venas (por ejemplo, trombosis venosa profunda), arterias (por ejemplo, aterotrombosis, infarto de miocardio, apoplejía isquémica), o cámaras cardíacas. Los trombos pueden obstruir el flujo de sangre en el sitio de la formación o separarse y embolizarse para bloquear un vaso sanguíneo distante (por ejemplo, embolia pulmonar, apoplejía).

[0003] La acumulación de evidencias demuestran que la aterotrombosis, una enfermedad mortal líder en el mundo, está vinculada a una inmunorregulación defectuosa que impulsa una activación patológica de los leucocitos de la sangre y una respuesta inflamatoria destructiva dentro de la pared vascular. En consecuencia, la restauración de la inmunorregulación en la interfase de los vasos sanguíneos representaría una opción terapéutica innovadora para luchar contra la aterotrombosis.

Trastornos autoinmunes

30

[0004] En los trastornos autoinmunes, el sistema inmunitario produce anticuerpos para un antígeno endógeno. Las células recubiertas de anticuerpos, como cualquier partícula extraña recubierta de manera similar, activan el sistema de complemento, dando como resultado una lesión del tejido. Los trastornos autoinmunes incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la enfermedad de Graves y la diabetes mellitus.

35

[0005] Varios mecanismos pueden explicar el ataque del cuerpo sobre sí mismo. Los autoantígenos pueden llegar a ser inmunogénicos porque se alteran químicamente, físicamente, o biológicamente. Ciertos productos químicos se acoplan con las proteínas del cuerpo, haciéndolas inmunogénicas (como en la dermatitis de contacto). Los fármacos pueden producir varias reacciones autoinmunes mediante la unión covalente al suero o proteínas de tejidos (véase más adelante). La fotosensibilidad ejemplifica la autoalergia inducida físicamente: la luz ultravioleta altera las proteínas de la piel, a las que el paciente se vuelve alérgico. En modelos animales, la infección persistente con un virus de ARN que se combina con los tejidos del huésped altera los autoantígenos biológicamente, lo que da lugar a un trastorno autoalérgico semejante a LES.

45

50

40

[0006] La mayoría de enfermedades autoinmunes humanas son enfermedades específicas de células T impulsdas por antígenos. Los clones de células T que responden a epítopos antigénicos específicos son responsables de la iniciación y/o la propagación de estas enfermedades. Del mismo modo, las respuestas de células T específicas impulsadas por antígenos son responsables del rechazo de aloinjertos de órganos y de la respuesta inmunitaria a los tumores. Las células T activadas proporcionan el "motor" para la inflamación crónica que está asociada con enfermedades autoinmunes, rechazo de injerto de órganos e inmunidad tumoral.

CD31 (PECAM-1)

55

[0007] Las respuestas inmunitariass pueden ser controladas por receptores inmunitarios inhibidores entre los que CD31 (PECAM-1) se expresa exclusivamente y constitutivamente en las células en la interfase de los vasos sanguíneos.

60 se

[0008] CD31 consiste en una molécula de cadena única que comprende seis dominios extracelulares de tipo Ig, un segmento transmembrana corto y una cola citoplásmica que contiene dos motivos inhibidores basados en inmunotirosina (ITIM). La estructura de CD31 se muestra en la siguiente tabla.

Dominio	Posición en SEQ ID NO: 1	la
Péptido señal	1 a 27	
Dominio extracelular	28 a 601	

Primer dominio extracelular de tipo IG	34 a 121
Segundo dominio extracelular de tipo IG	145 a 233
Tercer dominio extracelular de tipo IG	236 a 315
Cuarto dominio extracelular de tipo IG	328 a 401
Quinto dominio extracelular de tipo IG	424 a 493
Sexto dominio extracelular de tipo IG	499 a 591
Dominio de yuxtaposición a membrana	592 a 601
Dominio transmembrana	602 a 620
Dominio citoplasmático	621 a 738

[0009] Las propiedades inmunorreguladoras de CD31 están soportadas por el hecho de que la señalización de CD31 impulsa la repulsión mutua de los leucocitos de sangre y modula el equilibrio entre señales inhibidoras y estimulantes de ambas células inmunitarias innataa y adaptativas. El acoplamiento mecánico de los dominios extracelulares de tipo Ig distales de CD31 induce una señalización inhibidora fuera-dentro provocada por la fosforilación de sus ITIM y el reclutamiento y la activación de fosfatasas que contienen SH2.

[0010] Reinke et al. (2007, Journal of Neuroimmunology, 186: 86-93) describe un CD31 soluble quimérico fusionado a IgG-Fc humana y su potencial terapéutico para el tratamiento a corto plazo de la esclerosis múltiple.

[**0011]** Sato et al. (2001, The Journal of Rheumatology, 28 (11): 2460-2465) evaluaron los niveles séricos de CD31 soluble en pacientes que sufren de esclerosis sistémica y sugirieron que CD31 soluble sería un factor de protección.

[0012] Zehnder et al. (1995, Blood 85 (5): 1282-8) identificaron un anticuerpo CD31 que inhibía la reacción mixta de linfocitos (MLR) en una manera específica y dependiente de la dosis. Encontraron además que un péptido CD31 correspondiente al epítopo de este anticuerpo, es decir, a los 23 aminoácidos proximales a la membrana de CD31, inhibía fuertemente la MLR. Plantearon la hipótesis de que los 23 aminoácidos proximales a la membrana de CD31 constituyen una región funcionalmente importante y que el péptido CD31 interfiere con la activación de linfocitos al competir por la unión a epítopos. Sin embargo, Zehnder et al. no enseñaron si la señalización mediada por CD31 está activada o inhibida por el péptido CD31.

[0013] Chen et al. (1997, Blood 89 (4): 1452-9) mostraron que este péptido retrasaba la aparición de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y aumentaba la supervivencia a largo plazo en un modelo murino de la enfermedad. Plantearon la hipótesis de que el péptido CD31 inhibe una ruta común en la activación de células T. Una vez más, Chen et al. no consiguieron dilucidar el papel desempeñado por el péptido CD31 en la activación de células T. En particular, estos trabajos anteriores no evaluaron el supuesto efecto del péptido en la cascada de señalización CD31 y más precisamente en el estado fosforilación de los ITIM de CD31.

[0014] Mediante un mecanismo aún desconocido, el CD31 se "pierde" en ciertos linfocitos circulantes. Su pérdida se observa tras la activación de linfocitos y se ha demostrado recientemente que la ausencia de señalización de CD31 en linfocitos, a su vez, aumenta las respuestas inmunes patológicas implicadas en el desarrollo de la aterotrombosis.

[0015] También se ha descrito una forma soluble de CD31, debido a una variante de transcripción que carece del segmento transmembrana y, por lo tanto, actualmente se piensa que la cantidad individual de CD31 circulante está determinada genéticamente. En consecuencia, una serie de estudios previos han tratado de encontrar una correlación entre los niveles plasmáticos de CD31 soluble y el riesgo de aterotrombosis u otras enfermedades autoinmunes. Sin embargo, independientemente de los polimorfismos genéticos específicos analizados, los datos mostraron una amplia gama de valores de CD31 en plasma y los resultados de estos diferentes estudios se contradicen.

[0016] Por tanto, existe la necesidad de comprender mejor la función biológica de CD31. Esto permitiría el suministro de agentes terapéuticos más eficaces para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de células T.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

[0017] Sorprendentemente, se ha encontrado que la supuesta pérdida de CD31 en los linfocitos T activados/de memoria es en realidad incompleta y los resultados de la eliminación ("shedding") de CD31 entre los 5º y 6º dominios extracelulares de tipo Ig. El dominio extracelular eliminado ("shed") de CD31 (denominado en adelante como "CD31 eliminado") se libera a continuación en la circulación, donde está presente junto con una variante de empalme soluble de CD31.

[0018] Además, se ha demostrado que un alto riesgo de aterotrombosis está vinculado con el aumento de CD31 eliminado y la disminución de variante de empalme de CD31 en la circulación, y no con el nivel total de CD31 circulante.

[0019] El hallazgo de que el CD31 no se pierde en linfocitos de sangre, sino que sólo se escinde, proporciona una oportunidad única para rescatar a su función inmunorreguladora fisiológica mediante el reconocimiento de la parte residual de la molécula. Específicamente, la presente solicitud proporciona péptidos que corresponden a aminoácidos yuxtapuestos a membrana del ectodominio de CD31 que son capaces de rescatar la función inmunorreguladora fisiológico de CD31, incluso en pacientes que han perdido aparentemente CD31 de la superficie de sus linfocitos T circulantes.

[0020] Se ha demostrado que dichos péptidos son capaces de prevenir la progresión de la enfermedad y la formación de aneurismas en un modelo de ratón para la aterosclerosis. Péptidos más cortos y más estables limitados a los últimos 10 o 6 aminoácidos COOH-terminal del péptido conocido de veintitrés aminoácidos muestran propiedades inmunosupresoras superiores *in vitro* (DE inferior y menor variabilidad intraensayo e interensayo) que el péptido conocido. Estos aminoácidos corresponden a un fragmento extracelular corto comprendido entre la membrana y el 6º dominio de tipo Ig de CD31.

- 15 [0021] Por lo tanto, la solicitud proporciona péptidos que consiste en un fragmento que comprende la parte yuxtaproximal de membrana de CD31 extracelular y parte del sexto dominio de tipo Ig y el uso de tales péptidos en el tratamiento de un trastorno trombótico o un autoinmune, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.
- 20 [0022] Dichos péptidos tienen propiedades únicas en comparación con las formas solubles de CD31 que comprende toda o la mayoría de los dominios de tipo Ig de CD31. De hecho, tales péptidos son altamente homofílicos, ya que tienen una Kd de 10-7 M, tal como se evaluó por análisis BIAcore. Por lo tanto, son capaces de acoplar la señalización de CD31 mediante la unión por puente de la parte yuxta-proximal de membrana de CD31 extracelular que permanece expresado después de su escisión, a través de una fuerte homo-oligomerización. En contraste con esto, el CD31 soluble de corte y empalme alternativo carece de los primeros 10 aminoácidos yuxta-proximales de membrana y muestra una unión homofílica débil con el péptido de 23 unidades (Kd de 17 μM, como se evaluó por análisis BIAcore). Además, *in vitro*, sólo los péptidos descritos en este documento son capaces de acoplar la ruta de ITIM aguas abajo de la isoforma truncada de CD31, y por tanto son capaces de restaurar la señalización de CD31 en linfocitos T que han perdido aparentemente CD31.

[0023] La presente invención se define en las reivindicaciones.

Péptidos CD31

5

10

30

- [0024] Se ha descubierto que el péptido CD31 de seis aminoácidos de largo de la secuencia de SEQ ID NO: 2 y que un péptido CD31 de diez aminoácidos de largo de la secuencia de SEQ ID NO: 3 son capaces de inhibir la activación de células T. Estos dos péptidos corresponden a fragmentos que comprenden la parte yuxta-proximal de membrana de CD31 extracelular, que es adyacente al sexto dominio extracelular de tipo Ig de CD31.
- 40 **[0025**] Por lo tanto, la solicitud da a conocer un péptido aislado que comprende o consiste en un fragmento de CD31, en el que dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste en:
 - a) un fragmento de al menos 3, 6 ó 10 aminoácidos de la secuencia definida por los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1;
- b) un fragmento de al menos 3, 6 ó 10 aminoácidos de la secuencia correspondiente a (a) en un CD31 de mamífero 45 no humano; o
 - c) una secuencia de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a (a); con la condición de que dicho péptido de (c) no consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 6.
- [0026] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido" tiene el significado dado generalmente en la técnica. Más específicamente, la línea divisoria entre proteínas y péptidos normalmente se establece en una longitud de aproximadamente 50 aminoácidos. Los péptidos descritos en este documento tienen preferiblemente una longitud de como máximo 15 o 10 aminoácidos.
- [0027] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento" de una secuencia de referencia se refiere a una cadena de nucleótidos contiguos o aminoácidos que es más corta que la secuencia de referencia. Más específicamente, un fragmento de la secuencia definida por los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1, tal como se describe en el presente documento, tiene, como máximo, 22 aminoácidos de longitud. Dicho fragmento puede tener una longitud de, por ejemplo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos. Preferiblemente, dicho fragmento tiene una longitud dentro del intervalo de 3 a 15, 3 a 10, 6 a 15 o de 6 a 10 aminoácidos.
 - [0028] El péptido aislado descrito en el presente documento puede por ejemplo comprender o consistir en un fragmento que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SSTLAVRVFLAPWKK (aminoácidos 9 a 23 de la SEQ ID NO: 5), STLAVRVFLAPWKK (aminoácidos 10 a 23 de la SEQ ID NO: 5), TLAVRVFLAPWKK (aminoácidos 11 a 23 de la SEQ ID NO: 5), LAVRVFLAPWKK (aminoácidos 12 a 23 de la SEQ ID NO: 5), AVRVFLAPWKK (aminoácidos 13 a 23 de la SEQ ID NO: 5), VRVFLAPWKK (aminoácidos 16 a 23 de la SEQ ID NO: 5), RVFLAPWKK (aminoácidos 16 a 23 de la SEQ ID NO: 5), VFL

NO: 5), FLAPWKK (aminoácidos 17 a 23 de la SEQ ID NO: 5), LAPWKK (aminoácidos 18 a 23 de la SEQ ID NO: 5), APWKK (aminoácidos 19 a 23 de la SEQ ID NO: 5), PWKK (aminoácidos 20 a 23 de la SEC ID NO: 5), WKK (aminoácidos 21 a 23 de la SEQ ID NO: 5), SKILTVRVILAPWKK (aminoácidos 9 a 23 de la SEQ ID NO: 6), KILTVRVILAPWKK (aminoácidos 10 a 23 de la SEQ ID NO: 6), ILTVRVILAPWKK (aminoácidos 11 a 23 de la SEQ ID NO: 6), LTVRVILAPWKK (aminoácidos 12 a 23 de la SEQ ID NO: 6), TVRVILAPWKK (aminoácidos 13 a 23 de la SEQ ID NO: 6), VRVILAPWKK (aminoácidos 14 a 23 de la SEQ ID NO: 6), RVILAPWKK (aminoácidos 15 a 23 de la SEQ ID NO: 6), VILAPWKK (aminoácidos 16 a 23 de la SEQ ID NO: 6), ILAPWKK (aminoácidos 17 a 23 de la SEQ ID NO: 6), SSMRTSPRSSTLAVR (aminoácidos 1 a 15 de SEQ ID NO: 5), SSMRTSPRSSTLAV (aminoácidos 1 a 14 de la SEQ ID NO: 5), SSMRTSPRSSTLA (aminoácidos 1 a 13 de la SEQ ID NO: 5), SSMRTSPRSSTL (aminoácidos 1 a 12 de la SEQ ID NO: 5), SSMRTSPRSST (aminoácidos 1 a 11 de SEQ ID NO: 5), SSMRTSPRSS (aminoácidos 1 a 10 de SEQ ID NO: 5), SSMRTSPRS (aminoácidos 1 a 9 de la SEQ ID NO: 5), SSMRTSPR (aminoácidos 1 a 8 de la SEC ID NO: 5), SSMRTSP (aminoácidos 1 a 7 de la SEQ ID NO: 5), SSMRTS (aminoácidos 1 a 6 de la SEQ ID NO: 5), SSMRT (aminoácidos 1 a 5 de la SEQ ID NO: 5), SERAM (aminoácidos 1 a 4 de la SEQ ID NO: 5), SSM (aminoácidos 1 a 3 de SEQ ID NO: 5), NHASSVPRSKILTVR (aminoácidos 1 a 15 de SEQ ID NO: 6), NHASSVPRSKILTV (aminoácidos 1 a 14 de la SEC ID NO : 6), NHASSVPRSKILT (aminoácidos 1 a 13 de la SEQ ID NO: 6), NHASSVPRSKIL (aminoácidos 1 a 12 de SEQ ID NO: 6), NHASSVPRSKI (aminoácidos 1 a 11 de la SEQ ID NO: 6), NHASSVPRSK (aminoácidos 1 a 10 de la SEQ ID NO: 6), NHASSVPRS (aminoácidos 1 a 9 de la SEQ ID NO: 6), NHASSVPR (aminoácidos 1 a 8 de la SEQ ID NO: 6), NHASSVP (aminoácidos 1 a 7 de la SEQ ID NO: 6), NHASSV (aminoácidos 1 a 6 de la SEQ ID NO: 6), NHASS (aminoácidos 1 a 5 de la SEQ ID NO: 6), ANH (aminoácidos 1 a 4 de la SEQ ID NO: 6), de CNS (aminoácidos 1 a 3 de SEQ ID NO: 6), SMRTSPRSSTLAVRVFLAPWK (aminoácidos 2 a 22 de la SEQ ID NO: 5), TSPRSSTLAVRVFLA (aminoácidos 5 a 19 de la SEQ ID NO: 5), SPRSSTLAVRVFL (aminoácidos 6 a 18 de la SEQ ID NO: 5), PRSSTLAVRVF (aminoácidos 7 a 17 de la SEQ ID NO: 5), RSSTLAVRV (aminoácidos 8 a 16 de la SEQ ID NO: 5), SSTLAVR (aminoácidos 9 a 15 de la SEQ ID NO: 5), STLAV (aminoácidos 10 a 14 de la SEQ ID NO: 5), TLA (aminoácidos 11 a 13 de la SEQ ID NO: 5), SVPRSKILTVRVILA (aminoácidos 5 a 19 de la SEQ ID NO : 6), VPRSKILTVRVI L (aminoácidos 6 a 18 de la SEQ ID NO: 6), PRSKILTVRVI (aminoácidos 7 a 17 de la SEQ ID NO: 6), RSKILTVRV (aminoácidos 8 a 16 de la SEQ ID NO: 6), SKILTVR (aminoácidos 9 a 15 de la SEQ ID NO: 6), KILTV (aminoácidos 10 a 14 de SEQ ID NO: 6) y ILT (aminoácidos 11 a 13 de la SEQ ID NO: 6).

10

15

20

25

40

45

55

65

[0029] En una realización preferida descrita en este documento, dicho fragmento corresponde a un fragmento yuxtapuesto a la membrana, es decir a un fragmento inmediatamente adyacente al dominio transmembrana de CD31. En otras palabras, dicho fragmento corresponde preferiblemente a un fragmento que incluye el extremo C-terminal de la secuencia que consiste en los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1 o de la secuencia correspondiente en un CD31 de mamífero no humano. Por ejemplo, un péptido que consiste en un fragmento yuxtapuesto a la membrana de 15 aminoácidos de la secuencia definida por los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1 consiste en los aminoácidos 587 a 601 de la SEQ ID NO: 1.

[0030] En una realización específica descritas en el presente documento, los péptidos que comprenden el dominio transmembrana de CD31 o parte del mismo están excluidos.

[0031] La secuencia de péptidos CD31 descritos en este documento deriva preferiblemente de la secuencia de CD31 humano o murino. Sin embargo, la secuencia de CD31 puede derivar de cualquier secuencia de CD31 de mamífero no humano. La figura 1 muestra un alineamiento entre las secuencias de CD31 humano, murino, bovino y de cerdo. La secuencia correspondiente a la secuencia definida por los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1 se destaca en un cuadro. El experto en la técnica puede identificar fácilmente la secuencia correspondiente en otra proteína CD31 de mamífero no humano mediante la realización de una alineación de secuencias con las secuencias mostradas en la figura 1.

[0032] Además del fragmento de CD31, el péptido puede comprender opcionalmente secuencias heterólogas a CD31. Estas secuencias heterólogas pueden corresponder, por ejemplo, a una molécula portadora, tal como la hemocianina de lapa californiana (KLH), la albúmina de suero bovino (BSA), la ovoalbúmina (OVA), la tiroglobulina (THY) o el péptido antigénico múltiple (MAP).

[0033] En una realización preferida descrita en este documento, el péptido comprende o consiste en un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

- el péptido de seis aminoácidos de largo mostrado como SEQ ID NO: 2, que está presente en las secuencias de CD31 humano y murino;
- el péptido de diez aminoácidos de largo mostrado como SEQ ID NO: 3, la secuencia del cual se deriva de la secuencia de CD31 de ratón; y
- el péptido de diez aminoácidos de longitud mostrada como SEQ ID NO: 4, la secuencia del cual se deriva de la secuencia de CD31 humano.

[0034] En otra realización preferida descrita en este documento, el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 3 o 4.

[0035] Los péptidos CD31 descritos en este documento tiene la actividad biológica de ejercer una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro* y/o de inhibir la reacción mixta de linfocitos (MLR). Su actividad biológica puede por ejemplo medirse, tal como se describe en el Ejemplo 3, el Ejemplo 6 o en Zehnder et al. (1995, Blood 85 (5): 1282-8).

[0036] El ensayo de proliferación de células T puede comprender comparar la radiactividad incorporada en las células T cultivadas en presencia o en ausencia del compuesto a ensayar. Este ensayo puede realizarse por ejemplo de la siguiente manera:

- proporcionar una placa de múltiples pocillos que comprende medio completo suplementado con anticuerpos anti-CD3:
- suplementar los pocillos con concentraciones crecientes del compuesto a ensayar;
- emplacar células mononucleares de sangre periférica (por ejemplo, de células de bazo);
- cultivar las células durante aproximadamente 72 horas;
- añadir (3H) timidina y cultivar las células durante aproximadamente 16 horas;
- medir la radiactividad; y

5

10

15

25

40

45

50

55

- comparar la radiactividad medida en presencia del compuesto a ensayar con la radiactividad medida en ausencia de dicho compuesto, y/o en presencia de un compuesto de referencia, y/o en presencia de un control negativo.

[0037] Alternativamente, el ensayo de proliferación de células T puede comprender comparar los niveles del marcador de activación temprano CD69 en células T cultivadas en presencia o en ausencia del compuesto a ensayar. Este ensayo puede realizarse por ejemplo de la siguiente manera:

- proporcionar células CD4+ purificadas (por ejemplo, purificadas a partir de ratones C57BI6);
- estimular dichas células CD4+ mediante adición de anticuerpos purificados anti-CD3 y células dendríticas derivadas de médula ósea;
- cultivar las células durante aproximadamente 18 horas; y
- analizar dichas células para la expresión del marcador de activación temprana CD69, por ejemplo, por citometría de flujo; y
- comparar la expresión de CD69 en presencia del compuesto a ensayar.

[0038] Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de consulta descrita en este documento, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto es idéntica a la secuencia de consulta, excepto que la secuencia del polipéptido objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de consulta, hasta el 5% (5 de 100) de los residuos de aminoácidos en la secuencia objeto pueden insertarse, eliminarse o sustituirse por otro aminoácido.

[0039] Los procedimientos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, los programas disponibles en el paquete Wisconsin Sequence Analysis, versión 9.1, por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman y encuentra la mejor región única de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias también son conocidos en la técnica, por ejemplo, la familia de programas BLAST, accesible a través de la página del NCBI en el sitio web ncbi.nim.nih.gov) y FASTA.

[0040] Los péptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos "al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica" a una secuencia de referencia pueden comprender mutaciones, tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. En el caso de sustituciones, la sustitución corresponde preferiblemente a una sustitución conservativa tal como se indica en la siguiente tabla. En una realización preferida descrita en este documento, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de referencia sólo se diferencia de la secuencia de referencia por sustituciones conservativas. En otra realización preferida descrita en este documento, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de referencia. En todavía otra realización preferida descrita en este documento, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de referencia corresponde a una secuencia homóloga derivada de otra especie de mamífero no humano que la secuencia de referencia.

Sustituciones conservativas	Tipo de aminoácido
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	Aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas alifáticas
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Aminoácidos con cadenas laterales no cargadas pero polares
Asp, Glu	Aminoácidos con cadenas laterales ácidas
Lys, Arg, His	Aminoácidos con cadenas laterales básicas

Gly	Cadena lateral neutra
-----	-----------------------

[0041] En una realización preferida, el péptido de acuerdo con la invención consiste en una cualquiera de las secuencias mostradas en la siguiente tabla:

especie	Número de acceso Swissprot	posición	secuencia	SEQ ID NO:
humano	P16284	592-601	VRVILAPWKK	4
ratón	Q08481	581-590	VRVFLAPWKK	3
rata	Q3SWT0	580-589	VRVFLAPWKK	10
cerdo	Q95242	593-602	VRVYLAPWKK	11
bovino	P51866	591-600	VRVYL-PLEK	12

[0042] Los péptidos CD31 descritos en este documento pueden prepararse por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, tales como síntesis en fase sólida, síntesis en fase líquida o modificación genética. Como síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al extremo C-terminal del péptido a ser sintetizado se une a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, y mediante repetición alterna de reacciones, una en la que los aminoácidos con sus grupos amino y grupos funcionales de cadena lateral protegidos con grupos protectores apropiados se condensan uno a uno en orden desde el extremo C-terminal al N-terminal, y una en la que los aminoácidos unidos a la resina o el grupo protector de los grupos amino de los péptidos son liberados, la cadena peptídica se extiende por tanto de esta manera. Después de la síntesis del péptido deseado, se somete a la reacción de desprotección y se corta del soporte sólido.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

[0043] Los péptidos CD31 descritos en este documento pueden comprender opcionalmente modificaciones químicas que mejoran su estabilidad y/o su biodisponibilidad. Tales modificaciones químicas tienen por objeto la obtención de péptidos con una mayor protección de los péptidos frente a la degradación enzimática *in vivo*, y/o con una mayor capacidad de cruzar barreras de membrana, lo que aumenta su vida media y el mantenimiento o la mejora de su actividad biológica. Se puede emplear cualquier modificación química conocida en la técnica. Tales modificaciones químicas incluyen, pero no se limitan a:

- modificaciones en los extremos N-terminal y/o C-terminal de los péptidos, tales como, por ejemplo, acilación N-terminal (preferiblemente acetilación) o desaminación, o modificación del grupo carboxilo C-terminal en un grupo amida o un grupo alcohol;
- modificaciones en el enlace amida entre dos aminoácidos: acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el átomo de nitrógeno o el carbono alfa del enlace amida que une dos aminoácidos;
 - modificaciones en el carbono alfa del enlace amida que une dos aminoácidos, tales como, por ejemplo, acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el carbono alfa del enlace amida que une dos aminoácidos.
- cambios de quiralidad, tales como, por ejemplo, sustitución de uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) con los correspondientes enantiómeros D;
- retroinversiones en los que uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) se sustituyen por los correspondientes enantiómeros D, junto con una inversión de la cadena de aminoácidos (desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal);
- azapéptidos, en los que uno o más carbonos alfa se sustituyen por átomos de nitrógeno; y/o
- betapéptidos, en los que el grupo amino de uno o más aminoácidos está unido al carbono β en lugar del carbono α .

[0044] Por un péptido "aislado", se pretende que el péptido no está presente dentro de un organismo vivo, por ejemplo dentro del cuerpo humano. Sin embargo, el péptido aislado puede ser parte de una composición o un kit. El péptido aislado está preferiblemente purificado.

[0045] Los compuestos descritos en este documento pueden producirse mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, incluidas las tecnologías de síntesis química y tecnologías recombinantes.

[0046] Los ejemplos de tecnologías de síntesis química son la síntesis en fase sólida y la síntesis en fase líquida. Como síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al extremo C-terminal del péptido a ser sintetizado se une a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, y mediante repetición alterna de reacciones, una en la que los aminoácidos con sus grupos amino y grupos funcionales de cadena lateral protegidos con grupos protectores apropiados se condensan uno a uno en orden desde el extremo C-terminal al N-terminal, y una en la que los aminoácidos unidos a la resina o el grupo protector de los grupos amino de los péptidos son liberados, la cadena peptídica se extiende por tanto de esta manera. Los procedimientos de síntesis en fase sólida están en gran medida clasificados por el procedimiento tBoc y el procedimiento Fmoc, dependiendo del tipo de grupo protector utilizado. Los grupos protectores utilizados típicamente incluyen tBoe (t-butoxicarbonil), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxicarbonilo), Bzl (bencilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Mbh (4, 4'-dimetoxidibenzhidrilo), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo), Trt (tritilo), Tos (tosilo), Z (benciloxicarbonilo) y Clz-Bzl (2,6-diclorobencil) para los grupos amino; NO2 (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidino); y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo). Después de la síntesis del péptido deseado, se

somete a la reacción de desprotección y se corta del soporte sólido. Dicha reacción de corte peptídico puede ser llevada a cabo con fluoruro de hidrógeno o ácido tri-fluorometano sulfónico para el procedimiento Boc, y con TFA para el procedimiento Fmoc.

[0047] Alternativamente, el péptido puede sintetizarse utilizando técnicas recombinantes. En este caso, un ácido nucleico que codifica un péptido descrito en el presente documento (denominado también como "un ácido nucleico descrito en el presente documento") se clona en un vector de expresión. El ácido nucleico descrito en este documento se coloca preferiblemente bajo el control de señales de expresión (por ejemplo, un promotor, un terminador y/o un potenciador) que permite su expresión. El vector de expresión se transfecta a continuación en una célula huésped (por ejemplo una célula huésped de ser humano, CHO, ratón, mono, hongos o bacterias), y la célula huésped transfectada se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión del péptido.

[0048] El procedimiento para producir el péptido puede comprender opcionalmente las etapas de purificación de dicho péptido, químicamente modificando dicho péptido, y/o formulando dicho péptido en una composición farmacéutica.

[0049] La solicitud también describe un procedimiento para identificar un peptidomimético de un péptido descrito en el presente documento, siendo dicho peptidomimético un compuesto candidato para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune, que comprende las etapas de

- a) proporcionar un peptidomimético ; y
 - b) determinar si dicho peptidomimético ejerce:
 - i. una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro* y/o de la reacción mixta de linfocitos (MLR);
 - ii. una actividad inmunosupresora; y/o
- 25 iii. una actividad antiplaquetaria,
 - en el que, si dicho peptidomimético ejerce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro* y/o de la reacción mixta de linfocitos (MLR), una actividad inmunosupresora y/o una actividad antiplaquetaria, dicho peptidomimético es un compuesto candidato para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune.
 - [0050] La etapa (a) del procedimiento anterior puede comprender el diseño y síntesis de dicho peptidomimético.
 - [0051] La etapa (b) del procedimiento anterior para identificar un peptidomimético de un péptido descrito en el presente documento puede comprender o consistir en (i); (ii); (iii); (ii) y (iii); (iiii); (iiiii); (iiiii); (iiiii); (iiiiii); (iiiiii); (iiiiii); (iiiiiii); (iiiiiii); (iiiiiii)
 - **[0052]** Los procedimientos para determinar si dicho peptidomimético ejerce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro* y/o de la reacción mixta de linfocitos (MLR), una actividad inmunosupresora y/o una actividad antiplaquetaria son bien conocidos para el experto en la técnica.
- [0053] La determinación de si dicho peptidomimético ejerce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro* y/o de la reacción mixta de linfocitos (MLR) puede por ejemplo realizarse tal como se describe en el Ejemplo 3.
- [0054] La actividad inmunosupresora y antiplaquetaria puede ser evaluada por ejemplo mediante el análisis de la expresión de los marcadores de superficie de activación (por ejemplo, CD62P para las plaquetas y/o CD69 para leucocitos) o de marcadores de activación solubles (por ejemplo TXA2 para las plaquetas y/o IL-2 para linfocitos).
 - [0055] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "peptidomimético" se refiere a un compuesto que contiene elementos estructurales no peptídicos que imita la acción biológica de un péptido CD31 descrito en este documento. Los procedimientos para diseñar y sintetizar peptidomiméticos de un péptido determinado son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos en Ripka y Rich (Curr Opin Chem Biol 1998; 2 (4): 441-52) y en Patch y Barron (Curr . Opin Chem Biol 2002; 6 (6): 872-7).

Uso de péptidos CD31 para el tratamiento de trastornos trombóticos y autoinmunes

[0056] Se ha encontrado que los péptidos CD31 que corresponden a fragmentos que comprenden parte del sexto dominio extracelular de tipo Ig de CD31 son capaces de activar la señalización mediada por CD31, incluso en linfocitos T sin CD31 (es decir CD31 eliminado). Además, tales péptidos son capaces de prevenir la progresión de la enfermedad y la formación de aneurismas en un modelo de ratón para la aterosclerosis.

[0057] Por lo tanto, la solicitud da a conocer un péptido aislado que comprende o que consiste en

- a) los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1;
- b) los aminoácidos correspondientes a (a) en un CD31 de mamífero no humano;
- c) un fragmento de al menos 6 aminoácidos de (a);
- d) un fragmento de al menos 6 aminoácidos de (b); o
 - e) una secuencia al menos 80% idéntica a (a) o (c); para su uso en la activación de la señalización mediada por

8

55

50

15

30

35

- CD31. Estos péptidos descritos en este documento ejercen preferentemente una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro*. La activación de la señalización mediada por CD31 descrita en este documento puede ser una activación *in vitro* o *in vivo*.
- [0058] Como se usa en toda la presente memoria, el término "señalización mediada por CD31" se refiere a una ruta de señalización en la que está implicada CD31. Tales rutas son bien conocidas en la técnica e incluyen las descritas por ejemplo, en Newman y Newman (2003 Arterioscler Thromb Vasc Biol 23: 953-964) y en Newton-Nash y Newman (1999 J Immunol 163: 682-688).
- 10 [0059] La solicitud también da a conocer un péptido aislado que comprende o que consiste en:
 - a) los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1;
 - b) los aminoácidos correspondientes a (a) en un CD31 de mamífero no humano;
 - c) un fragmento de al menos 6 aminoácidos de (a);

25

30

35

40

45

50

55

- d) un fragmento de al menos 6 aminoácidos de (b); o
- e) una secuencia al menos 80% idéntica a (a) o (c); para su uso en el tratamiento de un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune. Estos péptidos descritos en este documento ejercen preferentemente una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro*.
- [0060] Como se usa en toda la presente memoria, el término "trastorno trombótico" incluye pero no se limita a la aterotrombosis, aterosclerosis, síndrome coronario agudo, apoplejía isquémica, enfermedad arterial periférica y aneurisma aórtico abdominal.
 - [0061] Como se usa en toda la presente memoria, el término "trastorno autoinmune" incluye pero no se limita a la artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de Graves y la diabetes mellitus.
 - **[0062]** En una realización preferida descrita en este documento, dicho trastorno trombótico o autoinmune se asocia con una pérdida del fenotipo de linfocitos T CD31⁺. De hecho, se ha encontrado sorprendentemente que los péptidos CD31 restauran la señalización de CD31 incluso en individuos con un fenotipo de linfocitos T CD31⁻. Por lo tanto, como se describe en el presente documento, los péptidos CD31 se utilizan preferiblemente para el tratamiento de un subgrupo de individuos y/o pacientes que tienen un fenotipo de linfocitos T CD31⁻.
 - [0063] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fenotipo de linfocitos T CD31-" se usa de forma intercambiable con el término "fenotipo de linfocitos T perd^{ado}". Estos términos se refieren al fenotipo de un individuo que ha perdido aparentemente CD31 en sus células T circulantes cuando se utilizan los procedimientos de la técnica anterior convencionales para detectar CD31, por ejemplo tales como los descritos en Stockinger et al. (Immunology, 1992, 75 (1): 53-8), Demeure et al. (Immunology, 1996, 88 (1): 110-5), Caligiuri et al. (Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25 (8): 1659-1664) o Caligiuri et al. (Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26 (3): 618-23). En tales procedimientos, el anticuerpo utilizado para la detección de CD31 se une a un epítopo localizado en uno cualquiera de los dominios extracelulares 1º a 5º de tipo Ig.
 - **[0064]** Preferiblemente, los individuos que tienen un fenotipo de linfocitos T CD31⁻ han perdido al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de su circulantes linfocitos T CD4⁺/CD31⁺ circulantes. En otras palabras, al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de sus linfocitos T circulantes son linfocitos CD31^{eliminados}. Se puede medir la tasa plasmática o la tasa celular de linfocitos T CD31⁻, en comparación con linfocitos T CD31⁺.
 - **[0065]** El péptido CD31 utilizado para la activación de la señalización mediada por CD31 y/o el tratamiento de un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune, tal como se describe en el presente documento, puede ser cualquiera de los péptidos descritos en el párrafo anterior titulado "péptidos CD31".
 - [0066] Alternativamente, el péptido CD31 utilizado para la activación de la señalización mediada por CD31 y/o el tratamiento de un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune, tal como se describe en el presente documento, comprende o consiste en:
 - a) los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1;
 - b) los aminoácidos correspondientes a (a) en un CD31 de mamífero no humano:
 - c) una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a (a) o (b);
 - **[0067]** Estos péptidos descritos en este documento preferiblemente comprenden o consisten en fragmentos inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de CD31. El péptido descrito en el presente documento puede corresponder, por ejemplo, a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 5 o 6. Estos péptidos descritos en el presente documento pueden comprender opcionalmente modificaciones químicas que mejoran su estabilidad y/o su biodisponibilidad.
- [0068] La solicitud también describe un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un péptido, tal como se describe en el presente documento, o un acido nucleico que lo codifica, a un individuo en necesidad del mismo. Dicho individuo en

necesidad del mismo padece preferiblemente de o está en riesgo de padecer un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune. Lo más preferiblemente, dicho individuo tiene un fenotipo de linfocitos T CD31⁻.

[0069] Por "cantidad efectiva", se entiende una cantidad suficiente para lograr una concentración de péptido que es capaz de prevenir, tratar o retrasar la enfermedad a tratar. Tales concentraciones pueden determinarse rutinariamente por los expertos en la técnica. La cantidad de compuesto realmente administrada se determinará típicamente por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares. También se entenderá por los expertos en la técnica que la dosificación puede depender de la estabilidad del péptido administrado.

[0070] Los individuos a tratar, tal como se describen en el presente documento, son preferiblemente individuos humanos. Sin embargo, también se da a conocer el uso veterinario de péptidos CD31 para el tratamiento de otros mamíferos.

Composiciones farmacéuticas

[0071] Los péptidos CD31 descritos en este documento pueden formularse en una composición farmacéutica. Así, la solicitud describe una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los péptidos de CD31 anteriores y un portador fisiológicamente aceptable. Los portadores fisiológicamente aceptables pueden prepararse mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica.

[0072] Las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un péptido, tal como se describe en el presente documento, incluyen todas las composiciones en las que el péptido o péptidos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el objetivo pretendido. Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y agentes auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, EE.UU., 1985), que es un texto de referencia estándar en este campo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse de forma rutinaria de acuerdo con el modo de administración, la solubilidad y la estabilidad de los péptidos. Por ejemplo, las formulaciones para administración intravenosa pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. El uso de biomateriales y otros polímeros para la administración de fármacos, así como las diferentes técnicas y modelos para validar un modo específico de administración, se describen en la literatura.

[0073] Los péptidos descritos en este documento pueden administrarse mediante cualquier medio que logre el objetivo pretendido. Por ejemplo, la administración puede lograrse mediante un número de diferentes rutas incluyendo, pero no limitado a, ruta subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intratecal, intranasal, oral, rectal, transdérmica, bucal, tópica, local, inhalante o uso subcutáneo.

[0074] Las dosificaciones a administrar dependen de las necesidades individuales, del efecto deseado y de la ruta de administración elegida. Se entiende que la dosificación administrada dependerá de la edad, sexo, salud, y peso del receptor, el tratamiento simultáneo, si lo hay, frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse mediante múltiples dosis o en una dosis única.

[0075] Dependiendo de la ruta de administración prevista, los compuestos se pueden formular como una forma líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones), sólida (por ejemplo, píldoras, comprimidos, supositorios) o semisólida (por ejemplo, cremas, geles).

[0076] En una realización preferida descrita en este documento, las composiciones se presentan en formas de dosificación unitarias para facilitar la dosificación exacta. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Las formas de dosificación unitaria típicas incluyen ampollas o jeringuillas prellenadas, premedidas de las composiciones líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas o similares en el caso de composiciones sólidas. En tales composiciones, el compuesto descrito en el presente documento es por lo general un componente menor (de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50% en peso o preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 40% en peso), siendo el resto diversos vehículos o portadores y coadyuvantes de procesamiento útiles para formar la forma de dosificación deseada.

[0077] Los compuestos descritos en este documento también se pueden administrar en formas de liberación sostenida o desde sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida.

[0078] La expresión "fisiológicamente aceptable" se entiende que abarca cualquier portador que no interfiera con la

10

50

55

60

65

10

15

20

25

30

35

40

eficacia de la actividad biológica del principio activo y que no sea tóxico para el huésped al que se administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, los principios activos anteriores se pueden formular en forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos, tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer.

[0079] Además del portador farmacéuticamente aceptable, las composiciones descritas en este documento también puede comprender cantidades menores de aditivos, tales como estabilizantes, excipientes, tampones y conservantes.

[0080] La solicitud también describe una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que codifica el péptido descrito en el presente documento en el marco de, por ejemplo, un tratamiento por terapia génica. En este caso, el ácido nucleico está presente preferiblemente en un vector, en el que se coloca la secuencia de codificación para el péptido bajo el control de señales de expresión (por ejemplo, un promotor, un terminador y/o un potenciador) que permiten su expresión. El vector, por ejemplo, se puede corresponder con un vector viral, tal como un vector adenoviral o un vector lentiviral.

[0081] La solicitud también describe kits que comprenden una composición farmacéutica que comprende un péptido de CD31 descrito en este documento y las instrucciones con respecto a la forma de administración. Estas instrucciones pueden indicar por ejemplo la indicación médica y/o la ruta de administración, y/o la dosis, y/o el grupo de pacientes a tratar.

[0082] A pesar de tener significados distintos, los términos "que comprende", "que tiene", "que contiene" y "que consiste en" se han utilizado de manera intercambiable en toda esta memoria y pueden ser reemplazados entre sí.

[0083] La invención se evaluará adicionalmente en vista de los siguientes ejemplos y figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0084]

5

20

25

35

40

45

50

55

60

65

La <u>figura 1</u> muestra un alineamiento entre las secuencias de CD31 humano, ratón, cerdo y bovino. La secuencia definida por los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 4 (CD31 humano) y la secuencia correspondiente en CD31 de ratón, cerdo y bovino se destacan con una caja.

La <u>figura 2</u> muestra un ejemplo representativo de análisis de citometría de flujo de 10 colores de células de sangre periférica humana de un donante sano. Lo controles de isotipo de anticuerpos anti-CD31 dom1 y anti-CD31 dom6 se muestran en las inserciones. Los linfocitos, monocitos y granulocitos se encerraron en la dispersión de FSC/SSC. Se identificaron linfocitos B (CD20 A700+) y linfocitos T (CD3 PE-TR+) y se encerraron dentro de "linfocitos" y las subpoblaciones CD8+ (PerCP) y CD4+ (APC) se encerraron dentro de linfocitos T. Las células T CD8+ y CD4+ se analizaron adicionalmente para la expresión de HLA-DR y CD45RA y en consecuencia se subdividen en células activadas (1), de memoria (2) y sin tratar (3). Todos los leucocitos fueron positivos para CD31 dom6. La falta de dom1 aumentó de las células T sin tratar (3) a de memoria (2) a activadas (1).

La <u>figura 3</u> muestra que la pérdida aparente de CD31 en los linfocitos es debida a su eliminación extracelular. a. Moléculas de CD31 unidas a la membrana de células solubilizadas se extrajeron de células T Jurkat CD4+ cultivadas y se acoplaron a microesferas fluorescentes. El porcentaje de moléculas unidas a microesferasdom1 es <6% en condiciones de reposo y >99% 5' después del acoplamiento TCR. b. La mayoría de CD31 solubles en el sobrenadante del cultivo (□) de células T activadas por TCR y en el plasma humano (■) se componen de un único fragmento truncado que comprende dom1-dom5 y carece de dom6. Niveles insignificantes de CD31 truncado que carece tanto de dom5 como de dom6 pudieron detectarse sólo en plasma.

La <u>figura 4</u> muestra que un péptido homotípico del fragmento extracelular residual en T CD31^{eliminado} induce la fosforilación de CD31-ITIM. a. Respuesta proliferativa al acoplamiento por TCR de células mononucleares de sangre periférica humana en presencia de dosis crecientes de péptido CD31 551-574. *p <0,05 vs dosis "0". b. Evlauación por citometría de flujo de la fosforilación de 686ITIM en CD31 unido a la membrana solubilizado a partir de células T Jurkat CD4+. Las proteínas solubilizadas fueron capturadas por microesferas CBA funcionales E9-PECAM-1.2 (dom6) y la detección se llevó a cabo por suero anti-pY686 de conejo seguido de anticuerpo secundario anti-conejo con AlexaFluor®. El histograma muestra la mediana de intensidad fluorescente (MFI) ± el % del coeficiente de variabilidad (CV%) de Alexafluor®488 (pY686) sobre microesferas adquiridas de 2000 E9-PECAM-1.2. Pervan = control positivo (pervanadato); CD3/CD28 = anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (1 μg/ml cada uno); péptido = péptido CD31 551-574 (100 μM)

La <u>figura 5</u> muestra que el péptido CD31 homotípico 551-574 inhibe las respuestas de células T. a Análisis BIAcore® de péptido CD31 551-574 de ratón homofílico que se une en diluciones de dos veces del analito (12,5, 25, 50 y 100 μM). Los datos se normalizan contra los canales de control y se expresaron como ΔRU (unidades de resonancia). b. Movilización del calcio intracelular inducida por TCR determinada por citometría de flujo en células de bazo cargadas con Fluo-3AM. Los datos se expresan como MFI (530/30 nm). Flecha gris = adición de anticuerpos anti-CD3/CD28 y reticulante solo (■ = control) o con el péptido 551-554 a 100 μM (•) o con anticuerpos anti-CD31 de ratón (O). c. Proliferación en respuesta a estimulación por TCR en células de bazo CD31 +/+ (columnas negras) y CD31-/- (columnas blancas). Una inhibición dependiente de la dosis se observa en células CD31 +/+, mientras que sólo la dosis más alta del péptido afecta a la proliferación de esplenocitos CD31 -/-. No se observó efecto con la dosis de

100 μ M del péptido revuelto en las células CD31 +/+ (columnade entrecruzamiento). *p <0,05 vs dosis de péptido anterior. d. Efecto inmunosupresor del péptido en el modelo DTH. * p <0,01 vs revuelto (columna de entrecruzamiento) y la dosis 10 μ M de péptido 551-574. Los datos se expresan como media \pm SEM.

La figura 6 muestra que la bioterapia con péptido CD31 evita la aceleración de la formación de aterosclerosis y aneurisma. a. Media ± SEM de área de superficie de la lesión aterosclerótica en secciones transversales en serie de la raíz aórtica a 200, 400, 600, 800 μm desde la aparición de la primera cúspide en ratones tratados con control (**1**) y el péptido 551-574 (□). * p <0,05 vs control, ANOVA, medidas repetidas. b. La presencia de un aneurisma aórtico abdominal (AAA) se evaluó macroscópicamente a ciegas por A.G. y A.N. después de una cuidadosa disección del tejido de la adventicia. Un aneurisma estaba presente en 8/10 (Exp # 1) o 6/8 (EXP # 2) ratones de control frente a sólo 1/8 ratones tratados con péptido en ambos experimentos (p <0,001 por prueba de Chi cuadrado). Las imágenes siguientes muestran un ejemplo de aneurisma (AAA; flechas) en comparación con la ausencia de aneurisma (sin AAA) de la aorta abdominal. c. Análisis por citometría de flujo del efecto del péptido (50 μM) en funciones de células T CD8 + (% de citólisis) y macrófagos (actividad de MMP-2/9). Los datos representan la media ± SEM de cultivos de 3-4 ratones/grupo. * p <0,05 vs control.

La <u>figura 7</u> muestra la puntuación clínica de la actividad EAE (nivel de parálisis). "pepREG" se refiere al péptido de SEQ ID NO: 3. "pepSCRA" se refiere al péptido de SEQ ID NO: 14.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

20 [0085]

10

SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de CD31 humano.

SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 10, 11 y 12 corresponden a los péptidos CD31 de acuerdo con la invención.

SEQ ID NOs: 5 y 6 corresponden a los péptidos CD31 para usar en los procedimientos descritos en este documento.

25 SEQ ID NO: 7 corresponde a la secuencia de CD31 murino.

SEQ ID NO: 8 corresponde a la secuencia de CD31 bovina.

SEQ ID NO: 9 corresponde a la secuencia de CD31 de cerdo.

SEQ ID NOs: 13 y 14 corresponden a péptidos revueltos utilizados como controles.

30 **EJEMPLOS**

35

40

45

50

55

60

Ejemplo 1 Material y procedimientos:

[0086] Evaluación de leucocitos en sangre CD31* y CD31eliminado. Se realizó citometría de flujo de diez colores en leucocitos de sangre periférica de 5 individuos sanos, ya sea en condiciones basales o después de la estimulación durante la noche con 1 μg/ml soluble de anticuerpo anti-CD3 purificado (R & D Systems). La citometría de flujo de diez colores se realizó después de lisis hipotónica de eritrocitos (10 minutos a 37°C 1:10 v:v en Tris 10 mM, NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, pH 7,4) en leucocitos de sangre periférica heparinizados de 5 individuos sanos, se fijaron en PBS/formaldehído al 1%/FCS al 1% durante 4 minutos a 37°C antes del procesamiento. Todos los experimentos en la sangre humana fueron aprobados por el Comité Ético Internacional (véase web clinicaltrials.gov; Identificador: NCT00430820). Se incubaron las células sedimentadas durante 30 minutos a temperatura ambiente y se protegieron de la luz con un cóctel de anticuerpos monoclonales fluorescentes dirigidos a CD3 (PE-Texas Red), CD4 (PE-Cy7), CD8 (PerCP), HLA-DR (APC-Cy7), CD45RA (Pacific Blue), y CD31 (WM59, PE) de BD Biosciences y anti-CD20 (AlexaFluor®700) y anti-CD31 (PECAM 1.2, FITC) de Invitrogen (1 μl de cada uno). Se adquirieron al menos 50.000 eventos en la puerta de linfocitos usando un BD LSRII® equipado con 3 láseres (405, 488 y 633 nm) y se analizaron con software BD DIVA® 6.0.

[0087] Medición sustractiva de CD31 soluble. Para detectar la variante de empalme y CD31 truncado en el plasma y el sobrenadante de cultivo, se ha personalizado una matriz de microesferas de citoquinas (CBA®, BD). Se acoplaron tres microesferas de CBA diferentes funcionalmente (A9, D5 y E9) con uno de los siguientes anticuerpos anti-CD31 purificados monoclonales JC70A (dominio 1, DAKO), MEM-05 (dominio 5, Zymed) y PECAM 1.2 (dominio 6, Invitrogen). Las microesferas acopladas se incubaron entonces con el plasma de los mismos 5 controles sanos (Figura 2) o el sobrenadante de cultivo y se detectó la unión positiva de CD31 circulante por un cuarto anticuerpo monoclonal anti-CD31, WM-59 (dominios 1-2) acoplado a PE (BD). La concentración de CD31 en plasma que incluye al menos el dominio 1 (JC70A), o dominios 1 a 5 (MEM-05) o todos los dominios extracelulares 1 a 6 de CD31 (PECAM 1.2) se determinó mediante el análisis de la mediana de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo de detección en ≥ 1.000 microesferas encerradas en muestras y diluciones en serie del mismo patrón (CD31 extracelular de longitud completa, recombinante, R & D Systems). Se obtuvo la curva estándar para cada una de las microesferas usando las mismas concentraciones conocidas del CD31 recombinante a fin de superar cualquier sesgo debido a las diferencias en la afinidad de unión de los diversos anticuerpos. La concentración en ng/ml de CD31 determinada con microesferas acopladas con PECAM 1.2 (dom 1-6) se restó de la obtenida usando microesferas acopladas a MEM-05 para obtener la cantidad de CD31 circulante que carece de dom6 (dom 1-5). Esta última se resta de la concentración de CD31 obtenida usando las microesferas acopladas a JC70A para calcular el valor de CD31 soluble que carece de dom 5 y 6, pero que contiene al menos los dominios 1 y 2 (dom 1-2).

[0088] Evaluación de la fosforilación de CD31-ITIM. Se dejaron sin estimular células Jurkat en fase logarítmica (10⁷ células/condición) (control negativo) o se incubaron con pervanadato (control positivo) o se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (R&D Systems, 1 μg/ml cada uno) en presencia o ausencia de péptido 551-574 (100 μM), o se incubaron con el péptido solo durante 20 minutos. Las células se lisaron entonces con 1 ml de tampón RIPA en hielo durante 30 minutos, se ultracentrifugaron y se incubaron 16 μl del sobrenadante con microesferas E9 CBA® funcionales (BD) recubiertas con PECAM 1,2 durante 2 horas a temperatura ambiente. Las microesferas se lavaron posteriormente con tampón de lavado CBA y se incubaron con 2 μl de suero de anti-CD31 fosfo-tirosina 686 (pY686) de conejo no diluido, seguido de dos lavados e incubación con fragmentos (Fab')₂ conjugados con AlexaFluor®488 (1:100 en tampón de lavado CBA) de IgG de cabra anti-conejo (Invitrogen). Las microesferas (2000/condición) fueron finalmente analizadas por citometría de flujo en el canal FITC (530/30 nm) y los datos se expresan como medianda de la intensidad de fluorescencia (MFI) ± el porcentaje del coeficiente de variabilidad (% CV) calculado con el software DIVA 6.0® (BD). Se incubaron alícuotas de lisado duplicado y diluciones en serie de CD31 recombinante con las microesferas recubiertas con PECAM 1.2 y se reveló la cantidad de CD31 unido a célula dom1+ usando anticuerpos anti-CD31 WM59-R-PE (dom1) y PECAM 1.2-FITC (dom6) (datos mostrados en la Figura 3a).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

[0089] <u>Unión a péptido fluorescente</u>. Para la visualización de la unión de péptido a células T CD4+ CD31+ y CD31eliminado, leucocitos de sangre periférica recién purificados preparados como se indica anteriormente se lavaron con una solución tamponada que contenía EDTA 2 mM (para evitar la endocitosis del péptido) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en una cámara humidificada oscura con péptido CD31 551-574 marcado con FITC 50 μM y una dilución 1:10 de anticuerpos monoclonales fluorescentes anti-CD4 (APC) y anti-CD31 (PE) (BD Biosciences) en una cámara de cultivo de 8 pocillos ibidi® recubierto con poli-D lisina (Biovalley). Las células se lavaron después dos veces, los núcleos se contratiñeron con DAPI y se adquirieron las imágenes digitales de una sección intracelular de 0,3 μm en un microscopio Zeiss Axiovert M200 (objetivo de inmersión en x63) equipado con el ApoTome® y una cámara digital monocromática refrigerada (Zeiss).

[0090] Ensayo de movilización de calcio. Se prepararon células de bazo de ratones C57BL/6, tal como se describe en Caligiuri et al. (2005 Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1659-1664). Se incubaron las células con Fluo-3AM (Invitrogen, # F1242) según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia del trazador unido a calcio se midió en el canal de FITC en un citómetro LSRII (BD Biosciences) antes de y durante 60 segundos después de la adición de anticuerpos monoclonales de hámster anti-CD3/CD28 de ratón (40 μg/ml cada uno) y compBead® de rata/hámster (1:50) ya sea solo o en presencia de anticuerpo de rata anti-CD31 de ratón (clon 390, 10 μg/ml) o en presencia de péptido CD31 551-574 (100 μΜ). Los controles negativos incluyeron control de isotipo IgG de rata y el péptido revuelto. Los anticuerpos y compBeads® eran de BD Biosciences.

[0091] Resonancia de plasmones superficiales. Se calcularon las constantes de asociación y disociación de unión homofílica mediante resonancia de plasmones superficiales (BIAcore® 2000, GE). En resumen, el péptido 551-574 se revistió a 3400 unidades de resonancia (RU) sobre chips CM5 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El péptido soluble 551-574 (12,5, 25, 50 y 100 μM en 200 μl de HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005%) se inyectó a 20 μl/min a 25°C, en el canal recubierto con péptido y en un canal sin recubrir. La disociación se controló durante 300 segundos. Las constantes de asociación (kon) y de disociación (koff) se calcularon utilizando el software BIAevaluation® 3.0 (GE). La inyección de péptido 551-574 en un canal recubierto con el péptido revuelto produjo una señal despreciable.

[0092] Evaluación de la inmunorregulación in vitro. La actividad citolítica mediada por células T CD8+ contra células de músculo liso aórtico de ratón alogénico y se realizó la medición de la actividad de gelatinasa de los macrófagos (MMP-2/9), tal como se describió anteriormente para las células humanas en Caligiuri et al. (2006 Arterioscler Thromb Vasc Biol 26: 618-623) utilizando kits y reactivos de Invitrogen. Brevemente, cultivos primarios de células de músculo liso de aorta de ratón FVB/N se marcaron con el trazador lipófilo DIO (verde) y se cocultivaron durante 3 horas con células de bazo enriquecidas con células T CD8+ de ratones C57BI/6 (n = 3 péptido revuelto y n = 3 péptido 551-574, 50 µM). La citolisis se evaluó mediante la acumulación intracelular de yoduro de propidio (PI). Las células se analizaron por citometría de flujo y se calculó el % de citólisis expresando el número de células muertas (PI+) entre las células diana (DIO+). Se midió la actividad de MMP-2/9 (gelatinasa) intracelular mediante citometría de flujo en macrófagos derivado de médula ósea de 7 días de ratones C57Bl/6 (n = 3 péptido revuelto y n = 3 péptido 551-574, 50 μM) tres horas después de la incorporación de gelatina OregonGreen® (MFI). La proliferación de células T se realizó usando cualquiera de las células mononucleares de sangre periférica humana de células de bazo de ratones C57Bl/6 (CD31+/+) y CD31-/- (Charles River Francia) como se ha descrito previamente (Caligiuri et al 2005 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25: 1659-1664). Brevemente, se sembraron las células por triplicado a 0,2x106 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en U en medio completo (RPMI 1640, 1% de piruvato, 1% de glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina-fungizona, 10% de suero de ternera fetal descomplementado, todos de Invitrogen) que contiene 1 μg/ml de anticuerpos anti-CD3/CD28 de ratón o 5 μg/ml de anticuerpos anti-CD3 humanos (BD) según sea apropiado. Se depositaron CD31 (551-574) y el péptido revuelto a una concentración final de 25, 50 y 100 μM en los pocillos justo antes de sembrado celular. Las células sembradas en placas se cultivaron durante 72 horas en 5% de CO2 a 37°C. Se añadió (3H) timidina (0,5 μCi/pocillo) durante las últimas 16 horas y la proliferación se evaluó usando un recolector Tomtec y análisis en un contador micro beta Wallac. Los datos se

expresan como media ± SEM de cpm por triplicado.

10

15

20

25

30

50

55

60

[0093] Evaluación de la inmunorregulación *in vivo*. Se evaluó la supresión de la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) como se describe en los "Current Protocols in Immunology (2001) 4.0.1-4.0.2 Unit 4.2". Brevemente, se disolvió TNCB (2-cloro-1,3,5-trinitrobenceno, Fluka # 79874) en acetona/aceite de oliva (1:1 v/v) a una concentración de 10 mg/ml. Se imprimaron los ratones BALB/c (n = 6/grupo) pintando las regiones afeitadas del abdomen a con un total de 0,2 ml de la preparación (n = 6/grupo). El experimento incluyó 3 grupos para el péptido 551-574 (10, 50, 100 μM) y 1 grupo tratado con péptido revuelto a 100 μM). Cinco días después de la imprimación, se pintaron 10 μl de la mezcla de TNCB-disolvente sobre el pabellón de la oreja derecha, 30 minutos después de administración subcutánea (interescapolar) del péptido 551-574 o el péptido revuelto. El aumento de grosor de la oreja se calculó restando el grosor del pabellón de la oreja derecha e izquierda de cada ratón (derecha-izquierda/izquierda x 100), medido a las 24 h con un calibrador de línea ("Pocotest", Kroeplin Längenmesstechnick). La medición se llevó a cabo 5 veces en cada oreja y se promedió para su posterior análisis. El efecto inmunosupresor del péptido se calculó como % de supresión = $(1-\Delta TE/\Delta TS)$ x 100, donde ΔT (grosor de la oreja 24 horas después de elicitación) - (grosor de la oreja basal), E = animales sensibilizados, S = animales tratados. Los datos se expresan como media ± SFM

[0094] Detección del tamaño de la lesión aterosclerótica y la formación de aneurismas. Se mantuvieron ratones de apolipoproteína E^{-/-} machos de 28 semanas de vida (n = 8-10 ratones/grupo) de nuestra instalación de cría en una dieta regular de chow y se mantuvieron bajo condiciones estándar. La aceleración de la aterosclerosis y formación de aneurismas fue inducida mediante la infución subcutánea de angiotensina II (Sigma, # A9525) (1 mg/kg/d) durante 28 días utilizando minibombas osmóticas (Alzet, # 2004), tal como se describe previamente (Daugherty et al. J Clin Invest 105: 1605-1612). Todos los experimentos fueron aprobados por nuestro comité ético institucional. El tamaño de la lesión aterosclerótica se midió como se describe previamente (Caligiuri et al 2005 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25: 1659-1664). Estos experimentos se repitieron dos veces con resultados similares.

[0095] <u>Péptidos</u>. Todos los experimentos en material humano se llevaron a cabo usando la secuencia de péptido humano mientras que el equivalente del ratón se utilizó en todos los experimentos de ratón. Las secuencias de los péptidos se muestran en la siguiente tabla.

humano	NH2 - NHASSVPRSKILTVRVILAPWKK - COOH	SEQ ID NO: 6
ratón	NH2 - SSMRTSPRSSTLAVRVFLAPWKK - COOH	SEQ ID NO: 5
revuelto	NH2 - SMPAVRSRFSATSLVTLKSRWPK - COOH	SEQ ID NO: 13

Ejemplo 2: La aparente pérdida de CD31 en la superficie de linfocitos de sangre es debido a su eliminación entre el 5º y 6º dominio extracelular de tipo Ig

[0096] Con el fin de establecer si la pérdida de CD31 se limitó a parte o se extendió a la totalidad de sus 6 dominios extracelulares de tipo Ig, se realizó un análisis de citometría de flujo multicolor de leucocitos de sangre entera de 5 donantes sanos usando dos anticuerpos diferentes que reconocen específicamente los domnios de tipo Ig distales a membrana y proximales a membrana. Para ser capaz de discriminar entre las diferentes poblaciones de leucocitos y evaluar su estado de maduración y activación, se utilizaron simultáneamente un panel de marcadores de linaje, así como la expresión de CD45RA y HLA-DR. Mientras que la expresión de CD31, tal como se detecta mediante un anticuerpo monoclonal específico para los primeros dominios de CD31 (clon WM-59, dom1-2) fue reconocido en células T de sangre sin tratar, pero no en células T en sangre activadas/de memoria, todas las células expresaron el fragmento extracelular proximal a membrana de la molécula detectada por otro anticuerpo monoclonal específico para el 6º dominio de tipo Ig de CD31 (clon PECAM 1.2, dom6), independientemente de su estado de maduración/activación (figura 2).

[0097] La citometría de flujo celular mostró que el acoplamiento de receptores de células T (TCR) induce un cambio de > 80% de las células T en reposo de la sangre de un fenotipo CD31 dom1*/dom6* a dom1*/dom66* (CD31*eliminado). El análisis molecular de las proteínas de membrana de cultivos de lisados de células T demostraron que > 99% de las moléculas CD31 unidas a células T disminuyen la porción distal que contiene dom1 ya 5 minutos después de la estimulación por TCR *in vitro* (Figura 3a). El análisis del sobrenadante mostró que, simultáneamente, una proteína soluble truncada individual limitada a los primeros 5 dominios de tiopo Ig de CD31 se acumula en el sobrenadante de cultivo (Figura 3b). Además, el análisis del plasma de los mismos donantes sanos mostró que la parte principal de CD31 soluble en el plasma estaba constituida por una molécula truncada que comprende dominios 1 a 5 de tipo Ig y que carecen específicamente del 6º dominio proximal a la membrana (Figura 3b) que siempre permanece anclado a los linfocitos aparentemente CD31-negativos (CD31 dom1*) *in vitro* e *in vivo*. Sólo una fracción mínima de CD31 soluble contenía los 6 dominios extracelulares predichas en la forma variante empalmada (Goldberger et al J Biol Chem. 269: 17183 a 17191) descrita previamente en sobrenadante de cultivo y en el plasma (Figura 3b). No hay otra escisión significativa de la molécula se produce aguas arriba del 5º dominio, ya que éste último estaba prácticamente siempre presente de forma concomitante con el primer dominio en las proteínas CD31 solubles truncadas (Figura 3b).

Ejemplo 3: Un péptido contenido en el fragmento de CD31 extracelular residual en células T CD31 eliminado aumenta la fosforilación de CD31-ITIM

[0098] Un péptido sintético derivado de CD31 dom6 correspondiente a los 23 aminoácidos yuxtapuestos a la membrana (551-574) del ectodominio de la molécula humana se une tanto a linfocitos T CD4+ CD31 dom1+ y CD31 dom1- (CD31eliminado) ex vivo. Es importante destacar que la unión de este péptido en las células T tiene consecuencias funcionales sobre el control de las células inmunes, ya que ejerce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T de sangre periférica humana *in vitro* (Figura 4a). Para evaluar si el efecto inhibidor del péptido podría estar mediado por la unión homofílica y el acoplamiento de la señalización por CD31, se evaluó el nivel de fosforilación de la tirosina de ITIM de CD31 en la posición 686 (686ITIM) en células T cultivadas. La estimulación de los TCR por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 solos o la sola presencia del péptido indujo un aumento menor de pY686 de CD31 (Figura 4b), pero la estimulación con TCR concomitante en presencia del péptido impulsó la fosforilación del 686ITIM de CD31 en un factor de> 23 (Figura 4b).

<u>Ejemplo 4</u>: El péptido homotípico CD31 551-574 inhibe una gran variedad de respuestas inmunes mediadas por células *in vitro* e *in vivo*

[0099] A fin de probar nuestra hipótesis, se llevaron a cabo en experimentos in vivo, y se sintetizó, por tanto, el equivalente murino del péptido CD31 (551-574). Sus propiedades se evaluaron in vitro e in vivo. Se estableció por primera vez su interacción homofílica por análisis de resonancia de plasmones superficiales (Figura 5a). Las constantes de asociación y disociación fueron de 134 ± 120 M⁻¹s⁻¹ y 1,58E-03 ± 1,07E-03 s⁻¹, respectivamente, y la afinidad en el equilibrio fue de $17.8 \pm 9.7 \mu M$, de acuerdo con la medición anterior realizada en la homodimerización de CD31 humano recombinante usando otros sistemas. Se evaluó a continuación si el péptido CD31 de ratón (551-574) era capaz de inhibir la movilización del calcio en respuesta al coacoplamiento del CD3 y de la molécula coestimuladora CD28 en linfocitos de bazo. Los datos mostraron que el reconocimiento homofílico de la porción yuxtapuesta a membrana de CD31 con este pequeño péptido es una estrategia inmunorreguladora tan eficiente como la coligación de CD3 y CD28 con la porción distal de CD31 por reticulación de las moléculas utilizando anticuerpos monoclonales específicos (Figura 5b). El acoplamiento de la vía molecular de CD31 por este péptido podría conseguir una supresión eficaz de las respuestas de linfocitos impulsadas por antígeno in vitro e in vivo. Se encontró que el péptido 551-574 inhibe de manera dependiente de la dosis la proliferación de células de bazo en respuesta a la estimulación de receptores de células T in vitro (Figura 5c). En dosis bajas, el efecto del péptido era exclusivamente debido a su unión homofílica con moléculas de CD31, ya que no se observó ningún efecto sobre las células de bazo de ratones CD31-/- (Figura 3c). Sin embargo, a altas concentraciones del péptido también se puede unir a otros ligandos heterófilos (baja afinidad) como se sugiere por su efecto a una dosis de 100 μM también en células que carecen de CD31 (Figura 5c). El péptido "revuelto", utilizado en la dosis más alta, fue ineficaz (Figura 5c). Por último, se evaluó el potencial inmunosupresor terapéutico de este péptido in vivo en el contexto de respuestas inmunes impulsadas por antígeno histocompatibles emparejadas utilizando un modelo de tipo retardado de hipersensibilidad. El recuerdo distal de una respuesta inmune específica producida por hapteno fue suprimida de una manera dependiente de la dosis por el péptido 551-574 en este modelo (Figura 5d). La inmunosupresión eficaz se consigue mediante una sola administración subcutánea de 50 uM del péptido 551-574 mientras que el péptido "revuelto" fue ineficaz (Figura 5d).

<u>Ejemplo 5</u>: La bioterapia con péptido de reconocimiento de células CD31^{eliminado} evita la progresión de la enfermedad y la formación de aneurismas en ratones ateroscleróticos

[0100] Se utilizó el modelo de infusión de angiotensina II en ratones con apolipoproteína E-/- envejecidos (25), este modelo que imita estrechamente la aterotrombosis en seres humanos. La administración subcutánea diaria de 50 μM del péptido evitó la aceleración del crecimiento de la placa en la raíz aórtica (Figura 6a) y la formación de aneurismas aterotrombóticas aórticas abdominales (AAA) en este modelo (Figura 6b). *In vitro*, el péptido 551-574 derivado de CD31 inhibió tanto la actividad de las enzimas degradan la matriz en macrófagos derivados de médula ósea como la citólisis dependiente de células T CD8+ de las células del músculo liso aórtico murino (figura 6c).

Ejemplo 6: Validación in silico e in vitro del péptido candidato péptido de 10 aminoácidos de largo "PepReg"

[0101] Se analizó un péptido anidado más corto correspondiente a los diez aminoácidos terminales COOH. Este péptido se muestra como SEQ ID NO: 3 y se refiere como "PepReg". Como se muestra en la tabla a continuación, se esperaba que este péptido fuera más estable que el péptido CD31 551-574 de 23 aminoácidos.

Tabla: Características de los PepReg vs el péptido CD31 de 23aa in silico

	PepReg CD31 564-574 (10 aa)	CD31 551-574 (23 aa)
secuencia	VRVFLAPWKK (SEQ ID NO: 3)	SSMRTSPRSSTLAVRV FLAPWKK (SEQ ID NO: 5)
número de aminoácidos	10	23

60

5

10

15

20

25

30

35

40

45

peso molecular	1243,5	2606,0
pi teórico	11,17	12,31
Fórmula	C62H98N16O11	C116H193N35O31S1
cargas - (Asp, Glu)/ + (Arg, Lys)	0/3	0/5
Índice de inestabilidad	25,38	65,09
Estimación de la vida media	100 horas	1,9 horas
(reticulocitos de mamífero, in vitro)		
índice alifático	107.00	68.83

[0102] Las propiedades inmunosupresoras de PepReg (10 aa) vs el péptido parental de 23 aa se evaluaron *in vitro*. Las células CD4+ negativamente purificadas de ratones C57Bl6 se estimularon por anticuerpos purificados anti-CD3 solubles y células dendríticas derivadas de médula ósea. Las células de los pocillos por triplicado se analizaron para la expresión del marcador de activación temprana CD69 después de 18 horas de cultivo en medio de RPMI completo suplementado con suero de ternera fetal al 10%. La citometría de flujo mostró que PepReg fue al menos tan eficiente como el péptido de 23aa en la supresión de la activación de células T, tal como se determina por el porcentaje de células CD4 que expresan CD69. Curiosamente, el efecto fue más reproducible (desviación estándar más pequeña) y se observó con dosis más bajas (50 μg/ml vs 100 μg/ml) de PepReg (10 aa) en comparación con el péptido parental (23 aa). La supresión de la proliferación de células T por PepReg se analizó mediante la incorporación de [H3] timidina y persistió hasta 7 días de cultivo a 37°C en suero al 10%, lo que demuestra que los datos relativos a la estabilidad del péptido obtenidos in silico se validaron *in vitro*.

Ejemplo 7: Validación *in vivo* del péptido candidato de péptido de 10 aminoácidos de longitud "PepReg" en el modelo de EAE

[0103] La encefalomielitis autoimmune experimental (EAE), también denominada encefalomielitis alérgica experimental, es un modelo animal de la esclerosis múltiple.

20 [0104] Se inmunizaron ratones C57BL/6J hembra de doce semanas de vida con 300 μg de péptido MOG35-55 emulsionado en adyuvante completo de Freund 1:1 en volumen que contenía 800 μg de tuberculosis de Mycobacterium desecado no viable H37RA. Se inyectó un volumen final de 200 μl de la emulsión por vía subcutánea en 4 sitios (50 μl/sitio) en los flancos. Además, se inyectaron intravenosamente 300 ng de la toxina pertussis (plexo retro-orbital) en el mismo día y 2 días más tarde. Los signos clínicos de EAE se evaluaron diariamente mediante el siguiente sistema de puntuación: 0, no hay signos; 1, debilidad de las extremidades posteriores; 2, debilidad de las extremidades posteriores y parálisis de la cola; 3, parálisis de las extremidades posteriores y de la cola; 4, parálisis de las extremidades posteriores y de la cola y debilidad de la extremidad anterior; 5, estado moribundo; y 6, muerte. El pico (fase creciente) se produjo alrededor del día 21. En este modelo de ratón C57BL/6J, no hubo fase menguante como se evaluó en nuestro laboratorio hasta el día 41.

[0105] El experimento se realizó con diez ratones por grupo. Los ratones de cada grupo se trataron con cualquiera de:

- PBS;

10

15

30

35

45

50

55

- PepReg (SEQ ID NO: 3); o
- PepScra (SEQ ID NO: 14).

[0106] La dosificación fue de 50 µg de péptido por ratones y por día (es decir, aproximadamente 2 mg/kg por día). El péptido fue administrado por inyección subcutánea.

40 **[0107]** La protección de la enfermedad se asoció con una reducción de la infiltración de células T CD4+ auxiliares IL17+ e IFNg+ y un aumento de la proporción de células CD4+ reguladoras CD25+/foxP3 en el sistema nervioso central de los ratones.

[0108] Como se muestra en la Figura 7, PepReg es capaz de detener el desarrollo de la enfermedad en la fase creciente (Día 15) y de reducir la extensión de la enfermedad en la fase de meseta (Días 21 hasta 35).

[0109] El péptido revuelto también fue beneficioso, aunque menos que PepReg. Este resultado sugiere que la composición de aminoácidos en lugar de la secuencia *per se* es importante para el efecto beneficioso. Este resultado tiene implicaciones importantes para el desarrollo de peptidomiméticos.

Ejemplo 8: Detección de CD31 eliminado en el plasma de pacientes que sufren de aterotrombosis y en individuos no afectados

[0110] La cantidad total de CD31, la cantidad de CD31 eliminado y la cantidad de CD31 empalmada se han medido en once individuos que sufren de aterotrombosis y en veintitrés individuos no afectados.

[0111] El grupo "aterotrombosis" comprendía once personas que sufren de dolor en el pecho, incluso en reposo y

presentaban una coronariografía anormal.

[0112] El grupo "Sin aterotrombosis" comprendía veintitrés personas. Se llevó a cabo un subanálisis en el grupo "sin aterotrombosis", que se encontró que comprendía:

- ocho individuos que presentan una coronariografía normal y un ecodoppler de carótida normal a pesar de dolor en el pecho;
- cuatro individuos que presentan un coronariografía normal a pesar del dolor en el pecho, pero en los que la aterosclerosis se detectó mediante ecodoppler de carótida; y
- once individuos que sufren de dolor en el pecho sólo en el esfuerzo y que presentan una coronariografía anormal (es decir, que sufre de aterosclerosis coronaria sin trombosis).

[0113] Se determinó la cantidad total de CD31, la cantidad de CD31 eliminado y la cantidad de CD31 empalmado de la siguiente manera.

- 1. La cantidad total (1 μl/prueba) de microesferas (E9, acopladas con el clon JC70A, DAKO) se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente desechado y sustituido por la misma cantidad de tampón de mejora de suero (BD # 51 -9002150), y se incubó a temperatura ambiente durante 15
 - 2. La mezcla de anticuerpos marcada fluorescentemente (PE-WM59; FITC-HC1/6; PB-PECAM1,2;) se preparó, cada una a 1 µg/ml, 1 µl cada una/condición.
- 3. Se preparó 1 tubo de precondición, conteniendo cada uno 3 ul de una dilución estándar o una muestra de 20 plasma. Las microesferas reconstituidas se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y el tampón de mejora del suero se sustituyó por la mezcla de anticuerpos marcados con fluorescencia. 3 μl de esta solución se distribuyeron en cada uno de los tubos que contenían la dilución estándar y las muestras, y la solución se incubó durante 1 hora a 4ºC en la oscuridad.
- 25 4. Se añadieron 150 μl de tampón de lavado (BD # 51-9003797) a cada tubo y se adquirió la señal.

[0114] Como se muestra en la tabla a continuación, el porcentaje de CD31 eliminado fue mayor en los individuos que sufren de aterotrombosis que en individuos no afectados, a pesar del hecho de que todas las personas sufrían de dolor de pecho.

Nivel en plasma de CD31	total	empalmado	eliminado
(ng/ml)			
Aterotrombosis (n = 11)	11,55 ± 0,7	$-7,02 \pm 2,69$	18,57 ± 2,67
Sin aterotrombosis (N =	11,58 ± 0,49	5,26 ± 1,850	6,31 ± 1,85
23)			
Prueba t Prob > F	0,9756	0,0007	0,0006

[0115] Las cantidades de CD31 total fueron similares en los cuatro grupos, mientras que la cantidad de CD31 eliminado y la cantidad de CD31 empalmado fueron significativamente diferentes en cada grupo de comparación apareada. El CD31 eliminado se incrementó en individuos con coronariografía anormal, con los valores más altos en aquellos que sufren de aterotrombosis. El CD31 emplamado todavía estaba presente en los pacientes que sufrían de aterosclerosis y sin aterotrombosis, mientras que era casi indetectable en pacientes que sufrían de aterotrombosis.

[0116] Estos resultados demuestran que los altos niveles de variantes empalmadas solubles de CD31 asociadas con bajos niveles de CD31 eliminado indica que el paciente sufre de dolor de pecho no específico, con el tiempo asociado con las placas carotídeas. Un ligero aumento de los niveles de CD31 eliminado asociados con niveles normales o reducidos de variantes empalmadas solubles de CD31 indica que el paciente sufre de aterosclerosis. Un aumento importante de los niveles de CD31 eliminado asociados con cantidades indetectables de variantes empalmadas solubles de CD31 indica que el paciente sufre de aterotrombosis.

Ejemplo 9: Discusión de los resultados

[0117] Las enfermedades disinmunes están vinculadas a la falta de un control adecuado de las respuestas inmunes. La aterosclerosis y sus complicaciones no sólo se deben a alteraciones metabólicas, pero se reconocen cada vez más como una enfermedad disinmune y una cuestión importante actual es la identificación de herramientas de intervención capaces de restaurar la inmunorregulación. Se ha demostrado previamente que las manifestaciones aterotrombóticos, tales como rotura de la placa y la trombosis (Caligiuri et al 2005 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25: 1659-1664) o la complicación de aneurismas (Caligiuri et al 2006 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26: 618-623) están asociadas con una reducción significativa de los linfocitos T CD31+ en la sangre periférica. En estos trabajos previos, se documentó la falta de la señalización de CD31 en los linfocitos generó respuestas inmunes proaterotrombóticas, mientras que la presencia de CD31 en las células T fue capaz de inhibirlas.

[0118] Aquí se demuestra que la pérdida asumida de la molécula en los linfocitos T activados/de memoria es en realidad incompleta y los resultados de la eliminación de CD31 entre el 5º y 6º dominio extracelular de tipo Ig. La

17

45

50

55

40

35

5

10

15

eliminación de CD31 se produjo inmediatamente después de la activación celular en linfocitos T y fue acompañada por la acumulación de la molécula truncada en el sobrenadante junto con niveles traza de la variante empalmada producida por las células. Este hallazgo fue insospechado debido a todas las pruebas comercialmente disponibles para detectar anticuerpos de uso CD31 en plasma dirigidos a dominios de CD31 1 a 5, y por lo tanto no pueden discriminar entre la variante empalmada (que contiene los 6 dominios extracelulares) y las formas truncadas (dominios 1 a 5) de CD31. El ensayo de inmunoabsorción sustractivo descrito en el presente documento es capaz de discriminar entre las dos formas de CD31 soluble y cuantificar con precisión la proporción de cada uno de ellos en el plasma. Este ensayo mostró que la mayor parte de CD31 en plasma comprende los dominios 1 a 5, pero carece del sexto dominio proximal a la membrana, que permanece anclado a los linfocitos CD31 dom1- de la sangre. Por lo tanto, se propone referirse a estos linfocitos como CD31 eliminado más que células CD31 "negativas". El trabajo previo *in vitro* había indicado que la eliminación de CD31 en una posición no identificada Nterminal del segmento transmembrana de la molécula puede aparecer en las células endoteliales que sufren apoptosis (Ilan et al 2001. Faseb J. 15: 362-372). Por primera vez, se demuestra en este documento que la eliminación es responsable de la pérdida de CD31 (incompleta) en linfocitos de sangre y que el CD31 en circulación se compone principalmente de una forma truncada derivada de su escisión entre los dominios 5 y 6 de tipo Ig, en lugar de la forma variante empalmada secretada. Los polimorfismos genéticos para CD31 se han descrito, pero el valor predictivo de los niveles de CD31 soluble era conflictivo en la aterotrombosis u otras enfermedades disinmunes. De hecho, mientras que la cantidad de la forma empalmada se puede predecir mediante diferentes variantes genéticas, la proporción de la forma resultante de la eliminación de proteína no está determinada por el polimorfismo del gen de CD31. Se propone que la disparidad entre los diferentes estudios fue debida al hecho de que CD31 circulante es una mezcla de la variante genética y de la forma truncada y la discriminación entre las dos formas de CD31 no era posible. El procedimiento de sustracción descrito en este documento permitirá a la diferenciación del valor pronóstico determinado por variantes genéticas de CD31, independientemente del vinculado a la eliminación de CD31.

25

30

35

10

15

20

[0119] El hecho de que CD31 no se pierde completamente en los linfocitos de la sangre ofrece una oportunidad única para rescatar su función inmunorreguladora fisiológica mediante el reconocimiento de la porción extracelular residual de la molécula. De hecho, se ha documentado en el presente documento que esto se puede lograr mediante una terapia basada en péptidos homotípicos, tanto *in vitro* como *in vivo*. La unión homofílica de este péptido mejoró considerablemente la fosforilación de 686ITIM CD31 e inhibió su proliferación inducida por TCR. La inducción de la fosforilación de ITIM de CD31 mediante reticulación mediada por anticuerpo de CD31 y moléculas de la superficie CD3 era conocida previamente por inhibir la movilización de calcio inducida por anticuerpos anti-CD3 en líneas de células T humanas. Sorprendentemente, se ha encontrado que el reconocimiento de la porción yuxtapuesta a la membrana membrana de CD31 con el péptido pequeño homotípico es una estrategia inmunorreguladora eficiente como la coligación de CD3 y CD28 con la porción distal de CD31 por reticulación de las moléculas con anticuerpos. La estrategia de un péptido sintético pequeño selectivo es obviamente más simple y también puede ser más seguro que usando proteínas grandes, tales como anticuerpos monoclonales y agentes de reticulación, para la bioterapia de trastornos inmunológicos (Isaacs 2007. Curr Opin Pharmacol 7: 418-425).

40

45

[0120] Con esta idea en mente, se evaluó si el acoplamiento de la vía molecular de CD31 por este péptido podría conseguir una supresión eficaz de las respuestas de linfocitos impulsada por antígenos *in vitro* e *in vivo* en el contexto de respuestas inmunes impulsadas por antígenos histocompatibles emparejadas. El recuerdo distal de una respuesta inmune específica producida por hapteno fue suprimido de una manera dependiente de la dosis mediante una única administración subcutánea del péptido. Un efecto protector similar de una sola inyección de péptido también se observó en la encefalomielitis autoinmune experimental (un modelo de ratón de esclerosis múltiple) y duró hasta 5 días.

55

50

[0121] En consecuencia, se evaluó si el rescate de la inmunorregulación mediada por CD31 por el péptido sintético 551-574 podría ser empleado en una bioterapia para luchar contra aterotrombosis, ya que la inmunorregulación mediada por CD31 típicamente se pierde en esta enfermedad. Se eligió utilizar el modelo inducido por angiotensina de la aterotrombosis porque la aceleración brusca del crecimiento de la placa aterosclerótica y el desarrollo de aneurismas aórticos abdominales complicados por un trombo en este modelo se producen simplemente por el exceso de biodisponibilidad de un péptido fisiológico - angiotensina II - y no requiere el uso de cirugía, la transferencia de genes o la dieta alta en grasas, cada uno de los cuales podría sesgar considerablemente la interpretación de los resultados. El péptido CD31 impidió tanto la aceleración del crecimiento de la placa en la raíz aórtica como la formación de aneurismas aórticos abdominales aterotrombóticos en este modelo. Dicho efecto protector drástico era superior a cualquier molécula terapéutica jamás probada y equivalente al alcanzado por la manipulación genética.

60

65

[0122] Los macrófagos y linfocitos representan las células inmunes más importantes implicadas en el desarrollo de la aterotrombosis. La función local de estas células lesionan los componentes celulares y extracelulares de las capas arteriales que resultan en la ruptura de placas y trombosis luminal, cuando se produce en la capa fibrosa de las placas ateroscleróticas, o la formación de aneurismas y finalmente la ruptura, cuando pasa en las capas exteriores de la artería. La degradación de la matriz extracelular es esencialmente debida a la actividad de metaloproteasas de la matriz derivadas de macrófagos, mientras que la muerte de las células del músculo liso arterial es causada supuestamente por citólisis mediada por células T. Sorprendentemente, los linfocitos T CD31+ ejercen una

importante función inmunosupresora en estos dos fenómenos que se agravan inversamente por células T CD31 eliminadas. Una reducción aberrante de células CD31+ en pacientes con aterotrombosis subyace en la inmunorregulación defectuosa observada en la enfermedad. Aquí se muestra que el péptido derivado de CD31 551-574 inhibe la actividad de las enzimas de degradación de la matriz y la citolisis dependiente de células T de las células de la pared arterial. La inmunorregulación transportada por este péptido es tan eficiente como la que se ejerza por células T CD31+ inmunorreguladoras y por lo tanto puede ser un contrapeso de la pérdida de la inmunorregulación fisiológica dependiente de CD31 en la aterotrombosis humana.

[0123] Esta es la primera vez que se prevé una bioterapia basada en péptidos para corregir la inmunorregulación defectuosa característica de la aterotrombosis y prevenir el desarrollo de la enfermedad en los pacientes. Además, dicha bioterapia puede ampliarse a otras enfermedades debilitantes disinmunes. En particular, los estudios experimentales han sugerido que la señalización por CD31 podría jugar un papel protector en la artritis reumatoide (Wong et al 2005. J Clin Immunol. 25: 19-28), esclerosis múltiple (Graesser et al 2002. J Clin Invest 109: 383-392) y la enfermedad de hígado graso no alcohólico (Goel et al 2007. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293: G1205-1214).

Ejemplo 10: Evaluación de noventa y seis péptidos descritos en la solicitud

20

30

35

40

50

65

[0124] Los noventa y seis péptidos que consisten en un fragmento que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- los aminoácidos 2 a 23, 3 a 23, 4 a 23, 5 a 23, 6 a 23, 7 a 23, 8 a 23, 9 a 23, 10 a 23, 11 a 23, 12 a 23, 13 a 23, 14 a 23, 15 a 23, 16 a 23, 17 a 23, 18 a 23, 19 a 23, 20 a 23 y 21 a 23 de la SEQ ID NO: 5; y
- los aminoácidos 2 a 23, 3 a 23, 4 a 23, 5 a 23, 6 a 23, 7 a 23, 8 a 23, 9 a 23, 10 a 23, 11 a 23, 12 a 23, 13 a 23, 14 a 23, 15 a 23, 16 a 23 y 17 a 23 de la SEQ ID NO: 6; y
- 25 los aminoácidos 1 a 22, 1 a 21, 1 a 20, 1 a 19, 1 a 18, 1 a 17, 1 a 16, 1 a 15, 1 a 14, 1 a 13, 1 a 12, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4 y 1 a 3 de SEQ ID NO: 5; y
 - los aminoácidos 1 a 22, 1 a 21, 1 a 20, 1 a 19, 1 a 18, 1 a 17, 1 a 16, 1 a 15, 1 a 14, 1 a 13, 1 a 12, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4 y 1 a 3 de SEQ ID NO: 6; y
 - los aminoácidos 2 a 22, 3 a 21, 4 a 20, 5 a 19, 6 a 18, 7 a 17, 8 a 16, 9 a 15, 10 a 14 y 11 a 13 de la SEQ ID NO: 5; y
 - los aminoácidos 2 a 22, 3 a 21, 4 a 20, 5 a 19, 6 a 18, 7 a 17, 8 a 16, 9 a 15, 10 a 14 y 11 a 13 de la SEQ ID NO: 6:
 - se ensayan para confirmar que estos péptidos inducen la fosforilación de CD31-ITIM. La fosforilación de CD31-ITIM se evalúa mediante el estudio del efecto de dosis crecientes de los péptidos descritos en este documento en la fosforilación de CD31-ITIM de células Jurkat cultivadas estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, como se describe en el Eiemplo 3.
 - [0125] Se confirma que los péptidos anteriores inhiben la proliferación de células T usando el protocolo descrito por Caligiuri et al. (2005 Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1659-1664).
 - [0126] Se confirma que los péptidos pueden lograr una inmunosupresión efectiva utilizando el protocolo descrito en Current Protocols in Immunology (2001, 4.0.1-4.0.2 Unit 4.2).
- [0127] La eficacia de los péptidos para el tratamiento de un trastorno trombótico se confirma en el modelo de infusión de angiotensina II en ratones envejecidos con apolipoproteína E -/-, que imita estrechamente la aterotrombosis en seres humanos.
 - [0128] La eficacia de los péptidos para el tratamiento de un trastorno autoinmune se confirma en el modelo de Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE), que es un modelo animal de esclerosis múltiple, y en un modelo para la artritis reumatoide.

<u>Ejemplo 11</u>: Evaluación de los péptidos descritos en la solicitud en un modelo animal de la artritis reumatoide (RA)

- [0129] Se confirma que los péptidos descritos en este documento (por ejemplo PepReg y/o los péptidos descritos en el Ejemplo 10) son capaces de detener el desarrollo de la enfermedad y/o reducir la extensión de la enfermedad en un modelo animal de la artritis reumatoide (AR).
- [0130] La artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmune inflamatorio crónica y sistémica que hace que el sistema inmune ataque las articulaciones. La enfermedad se caracteriza por hiperplasia sinovial agresiva (formación de pannus) y la inflamación (sinovitis), que, si se deja sin tratar, conducen a la destrucción progresiva del cartílago articular y el hueso. Las lesiones destructivas son el resultado de las respuestas inmunitarias y procesos inflamatorios innatos no específicos de antígeno. Varios estudios han demostrado que CD31 desempeña un papel fundamental en esta enfermedad desde el inicio de la enfermedad y la progresión se acelera en su ausencia.
 - [0131] Se utilizan ratones DBA/1 en este experimento. La inducción de la AR se inicia en ratones de 12 semanas de

vida. En el día 0, los ratones se inmunizaron por vía intradérmica en la base de la cola con 150 μg de colágeno bovino de tipo II (CII) emulsionado con un volumen igual de adyuvante completo de Freund que contiene 200 μg de tuberculosis por Mycobacterium H37RA. En el día 21, a los ratones se les administra una dosis de refuerzo (inyección intradérmica de 150 μg de CII bovino en adyuvante incompleto de Freund). Simultáneamente, los ratones reciben una inyección intravenosa de 50 μg de LPS. Los ratones son objeto de seguimiento durante dos meses. Después de la inmunización, los animales desarrollan una poliartritis autoinmune que se caracteriza por graves erosiones en cartílago y hueso. La AR inducida por colágeno en ratón comparte varias características clínicas, histopatológicas e inmunológicas con la AR humana.

- 10 **[0132]** Los péptidos descritos en el presente documento se administran siguiendo uno de los siguientes esquemas de tratamiento.
 - Esquema 1: administración preventiva. Se administran dos dosis (50 y 100 mg/kg) del péptido a los ratones un día antes de la inmunización con CII y entonces cada día, o dos veces a la semana, o semanalmente, durante el periodo de estudio (2 meses). Se administra un péptido con una secuencia "reviuelta" (es decir, un péptido que comprende los mismos aminoácidos que el péptido descrito en el presente documento, pero no la misma secuencia) a un grupo de control de ratones. El tratamiento se sigue durante un mes.
 - Esquema 2: Administración curativa. Se administran el péptido (50 y 100 mg/kg) y el péptido "revuelto" se administran a los ratones después del comienzo de los síntomas, cada día, o dos veces a la semana o cada semana hasta el final del estudio. Los grupos equivalentes de los ratones se mantienen en instalaciones de jaulas convencionales y se sangraron semanalmente de una vena de la cola para controlar el tiempo de sangrado y el desarrollo de anticuerpos patógenos específicos en suero (CDTA, Orleans).
 - [0133] El desarrollo de la artritis se controla mediante un examen físico 3 veces por semana. La inflamación en cada una de las 4 patas se clasifica en una escala de 0 a 3, y se acumularán las calificaciones de las 4 patas (produciendo una puntuación máxima de 12 por ratón). El índice de la artritis se calcula dividiendo la puntuación total en los ratones experimentales por el número de ratones artríticos.
 - **[0134]** También se siguen lesiones en las articulaciones. Las articulaciones de los tobillos de los ratones se extirpan 6 semanas después de la inmunización y se fijan en formalina al 10% tamponada, se descalcifican en EDTA al 10%, se embeben en parafina, se seccionan y se tiñen con hematoxilina y eosina. Se evalúan la intensidad de la hiperplasia sinovial, la inflamación celular y la formación de pannus, y la artritis se clasifica en una forma ciega en una escala de 0 a 4.
- [0135] La inmunohistoquímica se utiliza además para realizar un seguimiento y dar el fenotipo de células inflamatorias infiltradas en las articulaciones.
 - [0136] El estado de la inmunorregulación se evalúa midiendo los niveles de IgG1 e IgG2a en suero con respecto a CII. La medición se realiza por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La proliferación de células T aisladas de ganglios linfáticos de drenaje y el bazo se prueba mediante la incorporación de timidina ³H en respuesta a las células dendríticas cargadas con CII.
 - [0137] Las poblaciones de células en los órganos linfoides y en el líquido sinovial se analizaron por citometría de flujo.
- [0138] Este experimento permite que confirma que la administración continua de los péptidos descritos en este documento evita la aparición de la AR. La fase curativa permite evaluar el potencial terapéutico de los péptidos para el tratamiento de la AR en pacientes que no responden a las sustancias biológicas actuales (es decir, 40% de los pacientes). También se determinan las dosis y la frecuencia de las administraciones capaces de impulsar una regresión de las células inflamatorias en las articulaciones, y la regresión de la puntuación clínica.
 - LISTADO DE SECUENCIAS

[0139]

5

15

20

25

30

40

50

55 <110> INSERM

<120> UTILIZACIÓN DE PÉPTIDOS CD31 EN EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS TROMBÓTICOS Y AUTOINMUNES

60 <130> BET 09P0854

<150> EP 08305360.3 <151> 2008-06-30

65 <160> 14

```
<170> PatentIn version 3.4
     <210> 1
<211> 738
     <212> PRT
 5
     <213> Homo sapiens
     <220>
     <221> SEÑAL
10
     <222> (1)..(27)
     <220>
     <221> DOMINIO
15
     <222> (28)..(601)
     <223> dominio extracelular
     <220>
     <221> DOMINIO
     <222> (34)..(121)
20
     <223> Primer dominio de tipo IG
     <220>
     <221> DOMINIO
     <222> (145)..(233)
25
     <223> Segundo dominio de tipo IG
     <220>
     <221> DOMINIO
     <222> (236)..(315)
<223> Tercer dominio de tipo IG
30
     <220>
     <221> DOMINIO
     <222> (328)..(401)
35
     <223> Cuarto dominio de tipo IG
     <220>
     <221> DOMINIO
     <222> (424)..(493)
40
     <223> Quinto dominio de tipo IG
     <220>
     <221> DOMINIO
     <222> (499)..(591)
45
     <223> Sexto dominio de tipo IG
     <220>
     <221> DOMINIO
     <222> (602)..(620)
50
     <223> Dominio transmembrana
     <220>
     <221> DOMINIO
     <222> (621) . (738)
55
     <223> citoplasmático
     <400> 1
60
     Met Gln Pro Arg Trp Ala Gln Gly Ala Thr Met Trp Leu Gly Val Leu
     Leu Thr Leu Leu Cys Ser Ser Leu Glu Gly Gln Glu Asn Ser Phe
                  20
                                       25
65
```

Thr Ile Asn Ser Val Asp Met Lys Ser Leu Pro Asp Trp Thr Val Gln

			35					40					45			
5	Asn	G]y 50	Lys	Asn	Leu	Thr	Leu 55	Gln	Cys	Phe	Ala	Asp 60	٧al	Ser	Thr	Thr
10	ser 65	His	val	Lys	Pro	G1n 70	His	Gln	Met	Leu	Phe 75	Tyr	Lys	Asp	Asp	va1 80
	Leu	Phe	Tyr	Asn	Ile 85	Ser	Ser	Met	Lys	ser 90	Thr	Glu	Ser	Tyr	Phe 95	Ile
15	Pro	Glu	val	Arg 100	Ile	Tyr	Asp	Ser	Gly 105	Thr	Tyr	Lys	Cys	Thr 110	val	Ile
20	val	Asn	Asn 115	Lys	Glu	Lys	Thr	Thr 120	Ala	Glu	Tyr	Gln	Leu 125	Leu	val	Glu
25	Gly	val 130	Pro	Ser	Pro	Arg	Val 135	Thr	Leu	Asp	Lys	Lys 140	Glu	Ala	Ile	Gln
30	Gly 145	Gly	Ile	val	Arg	val 150	Asn	Cys	Ser	val	Pro 155	Glu	Glu	Lys	Ala	Pro 160
	Ile	His	Phe	Thr	Ile 165	Glu	Lys	Leu	Glu	Leu 170	Asn	Glu	Lys	Met	val 175	Lys
35	Leu	Lys	Arg	Glu 180	Lys	Asn	Ser	Arg	Asp 185	Gln	Asn	Phe	val	Ile 190	Leu	Glu
40	Phe	Pro	Val 195	Glu	Glu	Gln	Asp	Arg 200	val	Leu	Ser	Phe	Arg 205	Cys	Gln	Ala
45		Ile 210		Ser	Gly			Met			Ser	G]u 220	Ser	Thr	Lys	Ser
50	G1u 225	Leu	val	Thr	val	Thr 230	Glu	Ser	Phe	Ser	Thr 235	Pro	Lys	Phe	His	Ile 240
	Ser	Pro	Thr	Gly	Met 245	Ile	Met	Glu	Gly	Ala 250	Gln	Leu	His	Ile	Lys 255	Cys
55	Thr	Ile	Gln	va1 260	Thr	His	Leu	Ala	G1n 265	Glu	Phe	Pro	Glu	11e 270	Ile	Ile
60	Gln	Lys	Asp 275	Lys	Ala	Ile	val	Ala 280	His	Asn	Arg	нis	Gly 285	Asn	Lys	Ala
65	val	Tyr 290	Ser	val	Met	Ala	Met 295	val	Glu	His	Ser	Gly 300	Asn	Tyr	Thr	Cys
	Lys	val	Glu	ser	ser	Arg	Ile	ser	Lys	val	ser	ser	īle	val	val	Asn

	305					310					315					320
5	Ile	Thr	Glu	Leu	Phe 325	Ser	Lys	Pro	Glu	Leu 330	Glu	Ser	Ser	Phe	Thr 335	His
10	Leu	Asp	Gln	Gly 340	Glu	Arg	Leu	Asn	Leu 345	Ser	Cys	Ser	Ile	Pro 350	Gly	Ala
	Pro	Pro	Ala 355	Asn	Phe	Thr	Ile	Gln 360	Lys	Glu	Asp	Thr	Ile 365	val	Ser	Gln
15	Thr	Gln 370	Asp	Phe	Thr	Lys	Ile 375	Ala	Ser	Lys	Ser	Asp 380	Ser	Gly	Thr	Tyr
20	Ile 385	Cys	Thr	Ala	Gly	Ile 390	Asp	Lys	val	val	Lys 395	Lys	Ser	Asn	Thr	va1 400
25	Gln	Ile	val	val	Cys 405	Glu	Met	Leu	Ser	Gln 410	Pro	Arg	Ile	Ser	Tyr 415	Asp
30	Ala	Gln	Phe	Glu 420	val	Ile	Lys	Gly	Gln 425	Thr	Ile	Glu	val	Arg 430	Cys	Glu
	Ser	Ile	Ser 435	Gly	Thr	Leu	Pro	Ile 440	Ser	Tyr	Gln	Leu	Leu 445	Lys	Thr	Ser
35	Lys	va1 450	Leu	Glu	Asn	Ser	Thr 455	Lys	Asn	Ser	Asn	Asp 460	Pro	Ala	val	Phe
40	Lys 465	Asp	Asn	Pro	Thr	Glu 470	Asp	val	Glu	Tyr	Gln 475	Cys	val	Ala	Asp	Asn 480
45	Cys	ніѕ	Ser	ніѕ	Ala 485	Lys	Met	Leu	Ser	Glu 490	val	Leu	Arg	val	Lys 495	val
50	Ile	Ala	Pro	va1 500	Asp	Glu	val	Gln	Ile 505	Ser	Ile	Leu	Ser	Ser 510	Lys	val
	val	Glu	Ser 515	Gly	Glu	Asp	Ile	va1 520	Leu	Gln	Cys	Ala	va1 525	Asn	Glu	Gly
55	Ser	Gly 530	Pro	Ile	Thr	Tyr	Lys 535	Phe	Tyr	Arg	Glu	Lys 540	Glu	Gly	Lys	Pro
60	Phe 545	Tyr	Gln	Met	Thr	Ser 550	Asn	Ala	Thr	Gln	Ala 555	Phe	Trp	Thr	Lys	Gln 560
65	Lys	Ala	Ser	Lys	Glu 565	Gln	Glu	Gly	Glu	Tyr 570	Tyr	Cys	Thr	Ala	Phe 575	Asn
	Arg	Ala	Asn	His	Ala	Ser	Ser	val	Pro	Arg	Ser	Lys	Ile	Leu	Thr	val

				580					585					590		
5	Arg	val	Ile 595	Leu	Ala	Pro	Trp	Lys 600	Lys	Gly	Leu	Ile	Ala 605	val	val	Ile
10	Ile	Gly 610	val	Ile	Ile	Ala	Leu 615	Leu	Ile	Ile	Ala	Ala 620	Lys	Cys	Tyr	Phe
	Leu 625	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala 630	Lys	Gln	Met	Pro	va1 635	Glu	Met	Ser	Arg	Pro 640
15	Ala	val	Pro	Leu	Leu 645	Asn	Ser	Asn	Asn	Glu 650	Lys	Met	Ser	Asp	Pro 655	Asn
20	Met	Glu	Ala	Asn 660	Ser	ніѕ	Tyr	Gly	ніs 665	Asn	Asp	Asp	val	Arg 670	Asn	нis
25	Ala	Met	Lys 675	Pro	Ile	Asn	Asp	Asn 680	Lys	Glu	Pro	Leu	Asn 685	Ser	Asp	val
	Gln	Туг 690	Thr	Glu	٧al	Gln	va1 695	Ser	Ser	Ala	Glu	Ser 700	His	Lys	Asp	Leu
30	Gly 705	Lys	Lys	Asp	Thr	Glu 710	Thr	val	Tyr	Ser	Glu 715	val	Arg	Lys	Ala	va1 720
35	Pro	Asp	Ala	۷al	Glu 725	Ser	Arg	Tyr	Ser	Arg 730	Thr	Glu	Gly	Ser	Leu 735	Asp
40	Gly	Thr														
45	<212 <212	0> 2 1> 6 2> PI 3> A		icia ⁻	l											
50	<220 <223		éptio	do CI)31 d	deriv	/ado	de i	atór	n o h	numar	10				
30		0> 2 Δla	Pro	Trp	LVS	LVS										
55	1	πια		ρ	5	_,,										
60	<212	0> 3 1> 10 2> PI 3> A	RT	icia ⁻]											
	<220 <223		éptio	do CI)31 d	deriv	/ado	de i	atór	า						
65	<400	0> 3														
	val 1	Arg	Val	Phe	Leu 5	Ala	Pro	Trp	Lys	Lys 10						

```
<210> 4
     <211> 10
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <223> Péptido CD31 derivado de humano
10
     <400> 4
     Val Arg Val Ile Leu Ala Pro Trp Lys Lys 1 5 10
15
     <210> 5
<211> 23
     <212> PRT
     <213> Artificial
20
     <223> Péptido CD31 derivado de ratón
25
     <400> 5
     Ser Ser Met Arg Thr Ser Pro Arg Ser Ser Thr Leu Ala Val Arg Val
30
     Phe Leu Ala Pro Trp Lys Lys
                  20
35
     <210> 6
     <211> 23
     <212> PRT
     <213> Artificial
40
     <223> Péptido CD31 derivado de humano
     <400> 6
     Asn His Ala Ser Ser Val Pro Arg Ser Lys Ile Leu Thr Val Arg Val 1 5 10 15
45
     Ile Leu Ala Pro Trp Lys Lys
50
                  20
     <210> 7
<211> 727
<212> PRT
55
     <213> Mus musculus
     <400> 7
60
     Met Leu Leu Ala Leu Gly Leu Thr Leu Val Leu Tyr Ala Ser Leu Gln
     Ala Glu Glu Asn Ser Phe Thr Ile Asn Ser Ile His Met Glu Ser Leu
65
     Pro Ser Trp Glu Val Met Asn Gly Gln Gln Leu Thr Leu Glu Cys Leu
```

			35					40					45			
5	٧al	Asp 50	Ile	Ser	Thr	Thr	Ser 55	Lys	Ser	Arg	Ser	G]n 60	His	Arg	val	Leu
10	Phe 65	Tyr	Lys	Asp	Asp	Ala 70	Met	val	Tyr	Asn	va1 75	Thr	Ser	Arg	Glu	нis 80
	Thr	Glu	Ser	Tyr	Va1 85	Ile	Pro	Gln	Ala	Arg 90	val	Phe	His	Ser	Gly 95	Lys
15	Tyr	Lys	Cys	Thr 100	val	Met	Leu	Asn	Asn 105	Lys	Glu	Lys	Thr	Thr 110	Ile	Glu
20	Tyr	Glu	val 115	Lys	val	His	Gly	Val 120	Ser	Lys	Pro	Lys	val 125	Thr	Leu	Asp
25	Lys	Lys 130	Glu	val	Thr	Glu	Gly 135	Gly	val	val	Thr	val 140	Asn	Cys	Ser	Leu
30	Gln 145	Glu	Glu	Lys	Pro	Pro 150	Ile	Phe	Phe	Lys	Ile 155	Glu	Lys	Leu	Glu	val 160
	Gly	Thr	Lys	Phe	val 165	Lys	Arg	Arg	Ile	Asp 170	Lys	Thr	Ser	Asn	Glu 175	Asn
35	Phe	val	Leu	Met 180	Glu	Phe	Pro	Ile	Glu 185	Ala	Gln	Asp	His	val 190	Leu	val
40	Phe	Arg	Cys 195	Gln	Ala	Gly	Ile	Leu 200	Ser	Gly	Phe	Lys	Leu 205	Gln	Glu	Ser
45		Pro 210	Ile	Arg	Ser		Tyr 215		Thr	val		G1u 220	Ser	Phe	Ser	Thr
50	Pro 225	Lys	Phe	Glu	Ile	Lys 230	Pro	Pro	Gly	Met	11e 235	Ile	Glu	Gly	Asp	G1n 240
	Leu	His	Ile	Arg	Cys 245	Ile	val	Gln	٧al	Thr 250	His	Leu	val	Gln	G1u 255	Phe
55	Thr	Glu	Ile	Ile 260	Ile	Gln	Lys	Asp	Lys 265	Ala	Ile	val	Ala	Thr 270	Ser	Lys
60	Gln	Ser	Ser 275	Glu	Ala	val	Tyr	Ser 280	val	Met	Ala	Met	Va1 285	Glu	Tyr	Ser
65	Gly	His 290	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val 295	Glu	Ser	Asn	Arg	Ile 300	Ser	Lys	Ala	Ser
	Ser	Ile	Met	val	Asn	Ile	Thr	Glu	Leu	Phe	Pro	Lys	Pro	Lys	Leu	Glu

	305					310					315					320
5	Phe	Ser	Ser	Ser	Arg 325	Leu	Asp	Gln	Gly	G1u 330	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser 335	Cys
10	Ser	val	Ser	Gly 340	Thr	Pro	val	Ala	Asn 345	Phe	Thr	Ile	Gln	Lys 350	Glu	Glu
	Thr	val	Leu 355	Ser	Gln	Tyr	Gln	Asn 360	Phe	Ser	Lys	Ile	Ala 365	Glu	Glu	Ser
15	Asp	Ser 370	Gly	Glu	Tyr	Ser	Cys 375	Thr	Ala	Gly	Ile	Gly 380	Lys	val	val	Lys
20	Arg 385	Ser	Gly	Leu	val	Pro 390	Ile	Gln	val	Cys	Glu 395	Met	Leu	Ser	Lys	Pro 400
25	Ser	Ile	Phe	His	Asp 405	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile 410	Ile	Lys	Gly	His	Ala 415	Ile
30	Gly	Ile	Ser	Cys 420	Gln	Ser	Glu	Asn	Gly 425	Thr	Ala	Pro	Ile	Thr 430	Tyr	нis
	Leu	Met	Lys 435	Ala	Lys	Ser	Asp	Phe 440	Gln	Thr	Leu	Glu	Val 445	Thr	Ser	Asn
35	Asp	Pro 450	Ala	Thr	Phe	Thr	Asp 455	Lys	Pro	Thr	Arg	Asp 460	Met	Glu	Tyr	Gln
40	Cys 465	Arg	Ala	Asp	Asn	Cys 470	His	Ser	His	Pro	Ala 475	val	Phe	Ser	Glu	Ile 480
45	Leu	Arg	val	Arg	Val 485	Ile	Ala	Pro	val	Asp 490	Glu	٧a٦	val	Ile	Ser 495	Ile
50	Leu	Ser	Ser	Asn 500	Glu	val	Gln	Ser	Gly 505	Ser	Glu	Met	val	Leu 510	Arg	Cys
	Ser	۷al	Lys 515	Glu	Gly	Thr	Ser	Pro 520	Ile	Thr	Phe	Gln	Phe 525	Tyr	Lys	Glu
55	Lys	Glu 530	Asp	Arg	Pro	Phe	ніs 535	Gln	Ala	val	val	Asn 540	Asp	Thr	Gln	Ala
60	Phe 545	Trp	His	Asn	Lys	G1n 550	Ala	Ser	Lys	Lys	G1n 555	Glu	Gly	Gln	Tyr	Туг 560
65	Cys	Thr	Ala	Ser	Asn 565	Arg	Ala	Ser	Ser	Met 570	Arg	Thr	Ser	Pro	Arg 575	Ser
	Ser	Thr	Leu	Ala	val	Arg	٧a٦	Phe	Leu	Ala	Pro	Trp	Lys	Lys	Gly	Leu

				580					585					590		
5	Ile	Ala	va1 595	val	val	Ile	Gly	va1 600	val	Ile	Ala	Thr	Leu 605	Ile	val	Ala
10	Ala	Lys 610	Cys	Tyr	Phe	Leu	Arg 615	Lys	Ala	Lys	Ala	Lys 620	Gln	Lys	Pro	val
	Glu 625	Met	Ser	Arg	Pro	Ala 630	Ala	Pro	Leu	Leu	Asn 635	Ser	Asn	Ser	Glu	Lys 640
15	Ile	Ser	Glu	Pro	Ser 645	٧a٦	Glu	Ala	Asn	Ser 650	His	Tyr	Gly	Tyr	Asp 655	Asp
20	val	Ser	Gly	Asn 660	Asp	Ala	val	Lys	Pro 665	Ile	Asn	Gln	Asn	Lys 670	Asp	Pro
25	Gln	Asn	Met 675	Asp	val	Glu	Tyr	Thr 680	Glu	val	Glu	val	Ser 685	Ser	Leu	Glu
30	Pro	ніs 690	Gln	Ala	Leu	Gly	Thr 695	Arg	Ala	Thr	Glu	Thr 700	val	Tyr	Ser	Glu
	11e 705	Arg	Lys	٧a٦	Asp	Pro 710	Asn	Leu	Met	Glu	Asn 715	Arg	Tyr	Ser	Arg	Thr 720
35	Glu	Gly	Ser	Leu	Asn 725	Gly	Thr									
40	<212 <212	0> 8 L> 73 2> PF B> Bo	RT	aurus	5											
45	<400	0> 8														
	Met 1	Gln	Leu	Arg	Trp 5	Thr	Gln	Arg	Gly	Met 10	Met	Trp	Leu	Gly	Ala 15	Leu
50	Leu	Thr	Leu	Leu 20	Leu	Cys	Ser	Ser	Leu 25	Lys	Gly	Gln	Glu	Asn 30	Ser	Phe
55	Thr	Ile	Asn 35	Ser	Ile	His	Met	Gln 40	Ile	Leu	Pro	His	Ser 45	Thr	Val	Gln
60	Asn	G]y 50	Glu	Asn	Leu	Thr	Leu 55	Gln	Cys	Leu	val	Asp 60	٧a٦	Ser	Thr	Thr
65	Ser 65	Arg	val	Lys	Pro	Leu 70	His	Gln	val	Leu	Phe 75	Tyr	Lys	Asp	Asp	va1 80
	Leu	Leu	His	Asn	val	ser	ser	Arg	Arg	Asn	Thr	Glu	ser	Tyr	Leu	Ile

5	Pro	His	val	Arg 100	val	Cys	Asp	Ser	Gly 105	Arg	Tyr	Lys	Cys	Asn 110	val	Ile
	Leu	Asn	Asn 115	Lys	Glu	Lys	Thr	Thr 120	Pro	Glu	Tyr	Glu	Val 125	Trp	val	Lys
10	Gly	Val 130	Ser	Asp	Pro	Arg	val 135	Thr	Leu	Asp	Lys	Lys 140	Glu	val	Ile	Glu
15	Gly 145	Gly	val	val	val	val 150	Asn	Cys	Ser	val	Pro 155	Glu	Glu	Lys	Ala	Pro 160
20	val	ніѕ	Phe	Thr	Ile 165	Glu	Lys	Phe	Glu	Leu 170	Asn	Ile	Arg	Gly	Ala 175	Lys
25	Lys	Lys	Arg	Glu 180	Lys	Thr	Ser	Gln	Asn 185	Gln	Asn	Phe	val	Thr 190	Leu	Glu
	Phe	Thr	val 195	Glu	Glu	Gln	Asp	Arg 200	Thr	Ile	Arg	Phe	Gln 205	Cys	Gln	Ala
30	Lys	Ile 210	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn 215	val	Glu	Ser	Ser	Arg 220	Pro	Ile	Gln	Ser
35	Asp 225	Leu	val	Thr	val	Arg 230	Glu	Ser	Phe	Ser	Asn 235	Pro	Lys	Phe	His	Ile 240
40	Ile	Pro	Glu	Gly	Lys 245	val	Met	Glu	Gly	Asp 250	Asp	Leu	Gln	val	Lys 255	Cys
45	Thr	val	Gln	va1 260	Thr	His	Gln	Ala	G1n 265	Ser	Phe	Pro	Glu	Ile 270	Ile	Ile
	Gln	Lys	Asp 275	Arg	Glu	Ile	val	Ala 280	His	Asn	Ser	Leu	Ser 285	Ser	Glu	Ala
50	val	Tyr 290	Ser	val	Met	Ala	Thr 295	Thr	Glu	His	Asn	Gly 300	Asn	Tyr	Thr	Cys
55	Lys 305	val	Glu	Ala	Ser	Arg 310	Ile	Ser	Lys	val	Ser 315	Ser	val	val	val	Asn 320
60	val	Thr	Glu	Leu	Phe 325	Ser	Lys	Pro	Lys	Leu 330	Glu	Ser	Ser	Ala	Thr 335	His
65	Leu	Asp	Gln	Gly 340	Glu	Asp	Leu	Asn	Leu 345	Leu	Cys	Ser	Ile	Pro 350	Gly	Ala
	Pro	Pro	Ala 355	Asn	Phe	Thr	Ile	G1n 360	Lys	Gly	Gly	Met	Thr 365	val	Ser	Gln

5	Thr	G1n 370	Asn	Phe	Thr	Lys	Arg 375	val	Ser	Glu	Trp	Asp 380	Ser	Gly	Leu	Tyr
	Thr 385	Cys	val	Ala	Gly	va1 390	Gly	Arg	val	Phe	Lys 395	Arg	Ser	Asn	Thr	va1 400
10	Gln	Ile	Thr	۷al	Cys 405	Glu	Met	Leu	Ser	Lys 410	Pro	Ser	Ile	Phe	Ніs 415	Asp
15	Ser	Arg	Ser	Glu 420	val	Ile	Lys	Gly	G]n 425	Thr	Ile	Glu	val	Ser 430	Cys	Gln
20	Ser	val	Asn 435	Gly	Thr	Ala	Pro	Ile 440	Phe	Tyr	Gln	Leu	Ser 445	Asn	Thr	Ser
25	Lys	Pro 450	val	Ala	Asn	Gln	Ser 455	val	Gly	Ser	Asn	Lys 460	Pro	Ala	Ile	Phe
	Arg 465	val	Lys	Pro	Thr	Lys 470	Asp	val	Glu	Tyr	Cys 475	Cys	Ser	Ala	Asp	Asn 480
30	Cys	His	Ser	His	Ser 485	Lys	Met	Phe	Ser	Glu 490	٧a٦	Leu	Arg	val	Lys 495	val
35	Ile	Ala	Pro	va1 500	Asp	Glu	Ala	Gln	Leu 505	val	val	Leu	Lys	Gly 510	Glu	val
40	Glu	Pro	Gly 515	Glu	Pro	Ile	val	Phe 520	Tyr	Cys	Ser	val	Asn 525	Glu	Gly	Ser
45	Phe	Pro 530	Ile	Thr	Tyr	Lys	Phe 535	Tyr	Lys	Glu	Lys	Glu 540	Ser	Lys	Pro	Phe
	Tyr 545	Gln	Asp	Thr	Ile	Asn 550	Ala	Thr	Gln	Ile	Met 555	Trp	ніѕ	Lys	Thr	Thr 560
50	Ala	Ser	Lys	Glu	Tyr 565	Glu	Gly	Gln	Tyr	Tyr 570	Cys	Thr	Ala	Ser	Asn 575	Arg
55	Ala	Asn	Leu	Ser 580	Lys	His	٧a٦	Ile	Gln 585	Ser	Asn	Thr	Leu	Thr 590	val	Arg
60	val	Tyr	Leu 595	Pro	Leu	Glu	Lys	Gly 600	Leu	Ile	Ala	val	va1 605	val	Ile	Gly
65	٧al	Ile 610	Ile	Val	Thr	Leu	val 615	Leu	Gly	Ala	Lys	Cys 620	Tyr	Phe	Leu	Lys
	Lys 625	Ala	Lys	Ala	Lys	Gln 630	Met	Pro	val	Glu	Met 635	Ser	Arg	Pro	Ala	va1 640

5	Pro	Leu	Leu	Asn	Ser 645	Asn	Asn	Glu	Lys	Thr 650	Leu	Ser	Asp	Ala	G]y 655	Thr
	Glu	Ala	Asp	Arg 660	His	Tyr	Gly	Tyr	Asn 665	Glu	Asp	val	Gly	Asn 670	His	Ala
10	Met	Lys	Pro 675	Leu	Asn	Glu	Asn	Lys 680	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu 685	Asp	val	Glu
15	Tyr	Thr 690	Glu	val	Glu	val	Thr 695	Ser	Pro	Glu	Pro	Нis 700	Gln	Gly	Leu	Gly
20	Thr 705	Lys	Gly	Thr	Glu	Thr 710	Glu	Thr	val	Tyr	Ser 715	Glu	Ile	Arg	Lys	Ala 720
25	Asp	Pro	Asp	Phe	va1 725	Glu	Asn	Arg	Tyr	Ser 730	Arg	Thr	Glu	Gly	Ser 735	Leu
	Asp	Gly	Ser													
30	<211 <212	0> 9 L> 7 ² 2> PF		rofa	1											
35	<400		,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		•											
40	Met 1	Arg	Leu	Arg	Trp 5	Thr	Gln	Gly	Gly	Asn 10	Met	Trp	Leu	Gly	val 15	Leu
	Leu	Thr	Leu	G1n 20	Leu	Cys	Ser	Ser	Leu 25	Glu	Gly	Gln	Glu	Asn 30	Ser	Phe
45				20	Ile		Met	Ģļu	25 Met	Leu	Pro		Gln	30	Ser Val	
45 50	Thr	Ile	Asn 35	20 Ser	Ile	His	Met	Glu 40	25 Met	Leu	Pro	Gly	G]n 45	30 Glu		His
	Thr Asn	Ile Gly 50	Asn 35 Glu	20 Ser Asn	Ile Leu	His Thr	Met Leu 55	Glu 40 Gln	25 Met Cys	Leu Ile	Pro Val	Gly Asp 60	Gln 45 Val	30 Glu Ser	val	His Thr
50	Thr Asn Ser 65	Ile Gly 50 Ser	Asn 35 Glu Val	20 Ser Asn Lys	Ile Leu Pro	His Thr Gln 70	Met Leu 55 His	Glu 40 Gln Gln	25 Met Cys Val	Leu Ile Leu	Pro Val Phe 75	Gly Asp 60 Tyr	Gln 45 Val Lys	30 Glu Ser Asp	Val Thr	His Thr Val 80
50 55	Thr Asn Ser 65 Leu	Ile Gly 50 Ser	Asn 35 Glu Val	20 Ser Asn Lys Asn	Ile Leu Pro Val	His Thr Gln 70 Ser	Met Leu 55 His	Glu 40 Gln Gln	25 Met Cys Val	Leu Ile Leu Asn 90	Pro Val Phe 75 Thr	Gly Asp 60 Tyr Glu	Gln 45 Val Lys Ser	30 Glu Ser Asp	Val Thr Asp	His Thr Val 80

	Gly	Val 130	Ser	Asn	Pro	Arg	Val 135	Thr	Leu	Asp	Lys	Lys 140	Glu	٧a٦	Ile	Glu
5	Gly 145	Gly	val	val	Lys	∨a1 150	Thr	Cys	Ser	val	Pro 155	Glu	Glu	Lys	Pro	Pro 160
10	val	His	Phe	Ile	Ile 165	Glu	Lys	Phe	Glu	Leu 170	Asn	٧a٦	Arg	Asp	val 175	Lys
15	Gln	Arg	Arg	Glu 180	Lys	Thr	Ala	Asn	Asn 185	Gln	Asn	Ser	٧al	Thr 190	Leu	Glu
20	Phe	Thr	val 195	Glu	Glu	Gln	Asp	Arg 200	val	Ile	Leu	Phe	Ser 205	Cys	Gln	Ala
	Asn	Val 210	Ile	Phe	Gly	Thr	Arg 215	٧a٦	Glu	Ile	Ser	Asp 220	Ser	val	Arg	Ser
25	Asp 225	Leu	val	Thr	val	Arg 230	Glu	Ser	Phe	Ser	Asn 235	Pro	Lys	Phe	His	Ile 240
30	Ser	Pro	Lys	Gly	va1 245	Ile	Ile	Glu	Gly	Asp 250	Gln	Leu	Leu	Ile	Lys 255	Cys
35	Thr	Ile	Gln	va1 260	Thr	His	Gln	Ala	G]n 265	Ser	Phe	Pro	Glu	11e 270	Ile	Ile
40	Gln	Lys	Asp 275	Lys	Glu	Ile	val	Ala 280	His	Ser	Arg	Asn	Gly 285	Ser	Glu	Ala
	val	Tyr 290	Ser	val	Met	Ala	Thr 295	val	Glu	нis	Asn	Ser 300	Asn	Tyr	Thr	Cys
45	Lys 305	val	Glu	Ala	Ser	Arg 310	Ile	Ser	Lys	val	Ser 315	Ser	Ile	Met	val	Asn 320
50	Ile	Thr	Glu	Leu	Phe 325	Ser	Arg	Pro	Lys	Leu 330	Lys	Ser	Ser	Ala	Thr 335	Arg
55	Leu	Asp	Gln	Gly 340	Glu	Ser	Leu	Arg	Leu 345	Trp	Cys	Ser	Ile	Pro 350	Gly	Ala
60	Pro	Pro	Glu 355	Ala	Asn	Phe	Thr	Ile 360	Gln	Lys	Gly	Gly	Met 365	Met	Met	Leu
	Gln	Asp 370	Gln	Asn	Leu	Thr	Lys 375	٧a٦	Ala	Ser	Glu	Arg 380	Asp	Ser	Gly	Thr
65	Tyr 385	Thr	Cys	٧a٦	Ala	Gly 390	Ile	Gly	Lys	val	Va1 395	Lys	Arg	Ser	Asn	G1u 400

	val	Gln	Ile	Ala	Val 405	Cys	Glu	Met	Leu	Ser 410	Lys	Pro	Ser	Ile	Phe 415	His
5	Asp	Ser	Gly	Ser 420	Glu	val	Ile	Lys	Gly 425	Gln	Thr	Ile	Glu	Val 430	Ser	Cys
10	Gln	Ser	Ile 435	Asn	Gly	Thr	Ser	Pro 440	Ile	Ser	Tyr	Gln	Leu 445	Leu	Lys	Gly
15	Ser	Asp 450	Leu	Leu	Ala	Ser	Gln 455	Asn	val	Ser	Ser	Asn 460	Glu	Pro	Ala	val
20	Phe 465	Lys	Asp	Asn	Pro	Thr 470	Lys	Asp	val	Glu	Tyr 475	Gln	Cys	Ile	Ala	Asp 480
	Asn	Cys	His	Ser	ніs 485	Ala	Gly	Met	Pro	Ser 490	Lys	val	Leu	Arg	Val 495	Lys
25	val	Ile	Ala	Pro 500	val	Glu	Glu	val	Lys 505	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu 510	Ser	Glu
30	Glu	val	Glu 515	Ser	Gly	Gln	Ala	Ile 520	val	Leu	Gln	Cys	Ser 525	val	Lys	Glu
35	Gly	Ser 530	Gly	Pro	Ile	Thr	Tyr 535	Lys	Phe	Tyr	Lys	G1u 540	Lys	Glu	Asn	Lys
40	Pro 545	Phe	ніѕ	Gln	val	Thr 550	Leu	Asn	Asp	Thr	G]n 555	Ala	Ile	Trp	His	Lys 560
	Pro	Lys	Ala	Ser	Lys 565	Asp	Gln	Glu	Gly	G1n 570	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Ala 575	Ser
45	Asn	Arg	Ala	Thr 580	Pro	Ser	Lys	Asn	Phe 585	Leu	Gln	Ser	Asn	Ile 590	Leu	Ala
50	val	Arg	va1 595	Tyr	Leu	Ala	Pro	Trp 600	Lys	Lys	Gly	Leu	Ile 605	Ala	val	val
55	val	Ile 610	Ala	val	Ile	Ile	Ala 615	val	Leu	Leu	Leu	Gly 620	Ala	Arg	Phe	Tyr
60	Phe 625	Leu	Lys	Lys	Ser	Lys 630	Ala	Lys	Gln	Met	Pro 635	val	Glu	Met	Cys	Arg 640
0.5	Pro	Ala	Ala	Pro	Leu 645	Leu	Asn	Ser	Asn	Asn 650	Glu	Lys	Thr	Leu	Ser 655	Asp
65	Pro	Asn	Thr	G]u 660	Ala	Asn	Arg	His	Tyr 665	Gly	Tyr	Asn	Glu	Asp 670	val	Gly

```
Asn His Ala Met Lys Pro Leu Asn Glu Asn Lys Glu Pro Leu Thr Leu
5
     Asp Val Glu Tyr Thr Glu Val Glu Val Thr Ser Pro Glu Pro His Arg
     Gly Leu Gly Thr Lys Gly Thr Glu Thr Val Tyr Ser Glu Ile Arg Lys 705 710 715 720
10
     Ala Asp Pro Asp Leu Val Glu Asn Arg Tyr Ser Arg Thr Glu Gly Ser 725 730 735
15
     Leu Asp Gly Thr
20
     <210> 10
<211> 10
     <212> PRT
25
     <213> Artificial
     <223> Péptido CD31 derivado de rata
     <400> 10
30
     Val Arg Val Phe Leu Ala Pro Trp Lys Lys
35
     <210> 11
<211> 10
     <212> PRT
     <213> Artificial
40
     <220>
     <223> Péptido CD31 derivado de cerdo
     <400> 11
45
     Val Arg Val Tyr Leu Ala Pro Trp Lys Lys 1 5 10
     <210> 12
50
     <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
55
     <223> Péptido CD31 derivado de bovino
     <400> 12
     Val Arg Val Tyr Leu Pro Leu Glu Lys
1 5
60
     <210> 13
     <211> 23
<212> PRT
65
     <213> Artificial
```

REIVINDICACIONES

- 1. Péptido aislado que consiste en:
- a) un fragmento de 3 a 15 aminoácidos de la secuencia definida por los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1;
- b) un fragmento de 3 a 15 aminoácidos de la secuencia correspondiente a (a) en un CD31 de mamífero no humano: o
 - c) un fragmento de 3 a 15 aminoácidos que consiste en una secuencia al menos 80% idéntica a (a), en el que dicho péptido ejerce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro* y no consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 6;
- d) un péptido, tal como se ha definido en una cualquiera de (a)-(c), en el que uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) están sustituidos por el correspondiente enantiómero D;
 - e) un péptido, tal como se ha definido en una cualquiera de (a)-(c), en el que uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) están sustituidos por el correspondiente enantiómero D, junto con una inversión de la cadena de aminoácidos.
 - 2. Péptido, según la reivindicación 1, en el que dicho péptido consiste en:
 - a) un fragmento de 3 a 10 aminoácidos de la secuencia definida por los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1;
 - b) un fragmento de 3 a 10 aminoácidos de la secuencia correspondiente a (a) en un CD31 de mamífero no humano; o
- c) un fragmento que consiste en una secuencia al menos 80% idéntica a (a), en el que dicho péptido ejerce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro*.
 - 3. Péptido, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho fragmento es un fragmento yuxtapuesto a la membrana.
- 4. Péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a las SEQ ID NO: 2, 3 o 4.
 - 5. Péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho péptido comprende al menos una modificación química que mejora su estabilidad y/o su biodisponibilidad.
 - 6. Ácido nucleico aislado que codifica el péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
 - 7. Composición farmacéutica que comprende el péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el ácido nucleico de la reivindicación 6 y un portador fisiológicamente aceptable.
 - 8. Péptido que consiste en:
 - a) un fragmento de 3 a 15 aminoácidos de la secuencia definida por los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1;
 - b) un fragmento de 3 a 15 aminoácidos de la secuencia correspondiente a (a) en un CD31 de mamífero no humano;
 - c) un fragmento de 3 a 15 aminoácidos que consiste en una secuencia al menos 80% idéntica a (a), en el que dicho péptido ejerce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro*;
 - d) un péptido, tal como se ha definido en una cualquiera de (a)-(c), en el que uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) están sustituidos por el correspondiente enantiómero D;
 - e) un péptido, tal como se ha definido en una cualquiera de (a)-(c), en el que uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) están sustituidos por el correspondiente enantiómero D, junto con una inversión de la cadena de aminoácidos.
 - para utilizar en la activación de la señalización mediada por CD31 in vivo.
 - 9. Péptido que consiste en:
 - a) un fragmento de 3 a 15 aminoácidos de la secuencia definida por los aminoácidos 579 a 601 de la SEQ ID NO: 1;
- 50 b) un fragmento de 3 a 15 aminoácidos de la secuencia correspondiente a (a) en un CD31 de mamífero no humano;
 - c) un fragmento de 3 a 15 aminoácidos que consiste en una secuencia al menos 80% idéntica a (a), en el que dicho péptido ejerce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro*;
 - d) un péptido, tal como se ha definido en una cualquiera de (a)-(c), en el que uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) están sustituidos por el correspondiente enantiómero D;
- e) un péptido, tal como se ha definido en una cualquiera de (a)-(c), en el que uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) están sustituidos por el correspondiente enantiómero D, junto con una inversión de la cadena de aminoácidos.
 - para utilizar en en el tratamiento de un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune.
- 60 10. Péptido, según la reivindicación 8 o 9, para utilizar en el tratamiento de individuos que tienen un fenotipo de linfocitos T CD31⁻.
 - 11. Péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho péptido comprende al menos una modificación química que mejora su estabilidad y/o su biodisponibilidad.
 - 12. Péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicho péptido consiste en el péptido, según

65

15

30

35

40

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

- 13. Péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que dicho trastorno es:
- un trastorno trombótico seleccionado del grupo que consiste en aterotrombosis, aterosclerosis, síndrome coronario agudo, apoplejía isquémica, enfermedad arterial periférica y aneurisma aórtico abdominal; o
- un trastorno autoinmune seleccionado del grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves y diabetes mellitus.
- 14. Procedimiento para identificar un peptidomimético de un péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
 que es un compuesto candidato para el tratamiento y/o prevención de un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune, que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar un peptidomimético; y
 - b) determinar si dicho peptidomimético ejerce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T *in vitro* y/o de la reacción mixta de linfocitos (MLR);
- en el que, si dicho peptidomimético ejerce una inhibición dependiente de la dosis, dicho peptidomimético es un compuesto candidato para el tratamiento y/o prevención de un trastorno trombótico o un trastorno autoinmune.
 - 15. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la etapa (b) comprende además determinar si dicho peptidomimético ejerce una una actividad inmunosupresora y/o antiplaquetaria.

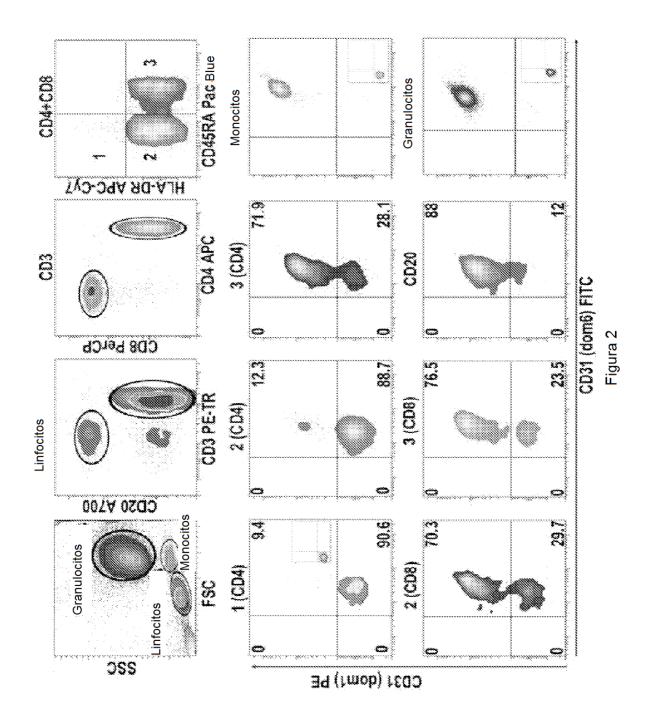
20

HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	MQPRWAQGATMWLGVLLTLELCSSLEGQENSFTINSVDMKSLPDWTVQNGKNLTLQCFAD 60MILALGLTLVLYASLQABENSFTINSIHMESLPSWEVMNGQQLTLECLVD 50 MQLRWTQRGMMWLGALLTLLLCSSLKGQENSFTINSIHMQILBHSTVQNGENLTLQCLVD 60 MRLRWTQGGMMWLGVLLTLQLCSSLEGQENSFTINSIHMEMLPGQEVHNGENLTLQCIVD 60)
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	VSTTSHVKPOHOMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKCTVIVNNKEKTT 12 ISTTSKSRSOHRVLFYKDDAMVYNVTSREHTESYVIPQARVFHSGKYKCTVMLNNKEKTT 11 VSTTSRVKPLHQVLFYKDDVLLHNVSSRRNTESYLIPHVRVCDSGRYKCNVILNNKEKTT 12 VSTTSSVKPQHQVLFYKDDVLFHNVSSTKNTESYFISEARVYNSGRYKCTVILNNKEKTT 12	, 0
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	AEYQLLVEGYPSPRVTLDKKEAIQGGIYRVNCSVPBEKAPIHFTIEKLELNEKMVKLKRE 18 IEYEVKVHGVSKPKVTLDKKEVTEGGVVVTVNCSLQEEKPPIFFKIEKLEVGTKFVKRRID 17 PEYEVWVKGVSDPRVTLDKKEVIEGGVVVVNCSVPBEKAPVHFTIEKFELNIRGAKKKRE 18 AEYKVVVEGVSNPRVTLDKKEVIEGGVVKVTCSVPBEKPPVHFIIEKFELNVRDVKQRRE 18	td IO
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	KNSRDQNFVILBFPVEBQDRVLSFRCQARIISGIHMQTSESTKSELVTVTESFSTPKFHI 24 KTS-NENFVLMBFPIBAQDHVLVFRCQAGIISGFKLQESBPIRSEYVTVQESFSTPKFBI 22 KTSQNQNFVTLBFTVEBQDRTIRFQCQAKIFSGSNVESSRPIQSDLVTVRESFSNPKFHI 24 KTANNQNSVTLBFTVEBQDRVILFSCQANVIFGTRVEISDSVRSDLVTVRESFSNPKFHI 24	9
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	SPTGMIMEGAQLHIKCTIQVTHLAQEFPEIIIQKDKAIVAHNRHGNKAVYSVMAMVEHSG 30 KPPGMIIEGDQLHIRCIVQVTHLVQEFTEIIIQKDKAIVATSKQSSEAVYSVMAMVEYSG 28 IPEGKVMBGDDLQVKCTVQVTHQAQSFPEIIIQKDREIVAHNSLSSEAVYSVMATTEHNG 30 SPKGVIIEGDQLLIKCTIQVTHQAQSFPEIIIQKDKEIVAHSRNGSEAVYSVMATVEHNS 30	19 10
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	NYTCKVESSRISKVSSIVVNITELFSKPELESSPTHLDQGERLNISCSIPGAPP-ANFTI 35 HYTCKVESNRISKASSIMVNITELFPKPKLEFSSSRLDQGELLDLSCSVSGTPV-ANFTI 34 NYTCKVEASRISKVSSVVVNVTELFSKPKLESSATHLDQGEDLNLLCSIPGAPP-ANFTI 35 NYTCKVEASRISKVSSIMVNITELESRPKLKSSATRLDQGESLRIWCSIPGAPPEANFTI 36	8
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	OKEDTIVSQTQDFTKIASKSDSGTYICTAGIDKVVKKSNTVQIVVCEMLSQPRISYDAQF 41 QKEETVLSQYQNFSKIAEESDSGEYSCTAGIGKVVKRSGLVPIQVCEMLSKPSIFHDAKS 40 QKGGMTVSQTQNFTKRVSEWDSGLYTCVAGVGRVPKRSNTVQITVCEMLSKPSIFHDSRS 41 QKGGMMNLQDQNLTKVASERDSGTYTCVAGIGKVVKRSNEVQIAVCEMLSKPSIFHDSGS 42	9
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	EVIKGQTIEVRCESISGTLPISYQLLKTSKVLENSTKNSNDFAVFKDNPTEDVEYQCVAD 47 EIIKGHAIGISCQSENGTAPITYHLMKAKSDFQTLEVTSNDPATFTDKPTRDMEYQCRAD 46 EVIKGQTIEVSCQSVNGTAPIFYQLSNTSKPVANQSVGSNKPAIFRVKPTKDVEYCCSAD 47 EVIKGQTIEVSCQSINGTSPISYQLLKGSDLLASQNVSSNEPAVFKDNPTKDVEYQCIAD 48	18 19
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	NCHSHAKMLSEVLRYKVIAPYDEVQISILSSKVYESGEDIVLQCAVNEGSGPITYKFYRE 53 NCHSHFAVPSEILRVRVIAPYDEVVISILSSNEVQSGSEMVLRCSVKEGTSPITFQFYKE 52 NCHSHSKMFSEVLRYKVIAPYDEAQL-VVLKGEVEPGEPIVFYCSVNEGSFPITYKFYKE 53 NCHSHAGMPSKVLRYKVIAPYEEVKLSILLSEEVESGQAIVLQCSVKEGSGPITYKFYKE 54	8
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	KEGKPFYOMTSNATQAFWTKOKASKEQEGEYYCTAFNRANHASSVPRSKILTVRVILAPW 59 KEDRPEHOAVVNDTOAFWHNKQASKKOEGQYYCTASNRASSMRTSPRSSTLAVRVFLAPW 58 KESKPFYODTINATQIMWHKTTASKEYEGQYYCTASNRANLSKHVIQSNTLTVRVYL-PL 59 KENKPFHOVTLNDTOAIWHKPKASKDQEGQYYCLASNRATPSKNFLQSNILAVRVYLAPW 60	18
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	KKGLIAVVIIGVIIALUIIAAKCYFLRKAKAKOMPVEMSRPAVPILINSNNEK-MSDPNME 65 KKGLIAVVVIGVVIATLIVAAKCYFLRKAKAKOKPVEMSRPAAPLLINSNSEK-ISEPSVE 64 EKGLIAVVVIGVIIVTLIVIGAKCYFLKKAKAKOMPVEMSRPAVPLLINSNNEKTLSDAGTE 65 KKGLIAVVVIAVIIAVLLIGARFYFLKKSKAKOMPVEMCRPAAPLLINSNNEKTLSDPNTE 66	7

Figura 1a

HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	ANSHYGHNDDVRNHAMKPINDNKEPLNSDVQYTEVQVSSAESHKDLGKKDTETVYSEV 716 ANSHYGYDDVSGNDAVKPINQNKDPQNMDVEYTEVEVSSLEPHQALGTRATETVYSEI 705 ADRHYGYNEDVGNHAMKPLNENKEPLTLDVEYTEVEVTSPEPHQGLGTKGTETVYSEI 717 ANRHYGYNEDVGNHAMKPLNENKEPLTLDVEYTEVEVTSPEPHRGLGTKGTETVYSEI 718
HUMANO RATÓN BOVINO CERDO	RKAVPDAVESRYSRTEGSLDGT 738 RKVDPNLMENRYSRTEGSLDGT 727 RKADPDEVENRYSRTEGSLDGS 739 RKADPDLVENRYSRTEGSLDGT 740

Figura 1b



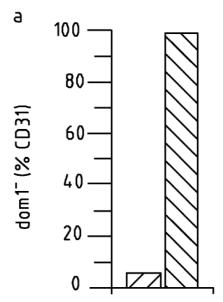
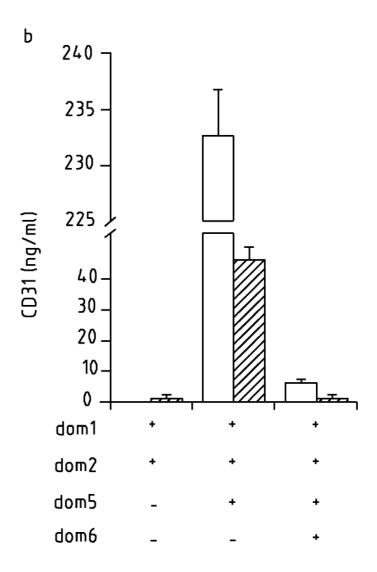


Figura 3



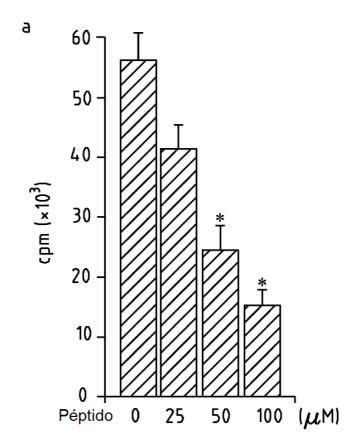
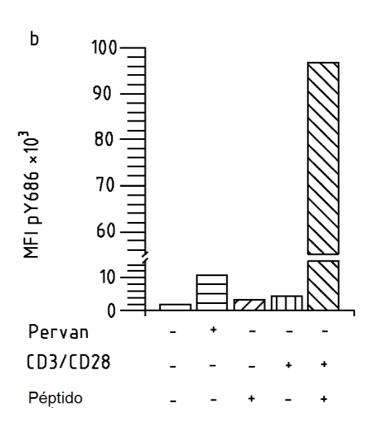
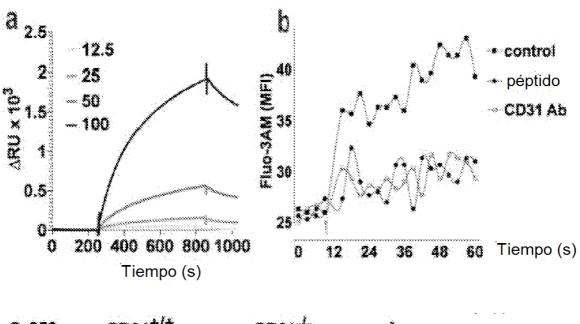


Figura 4





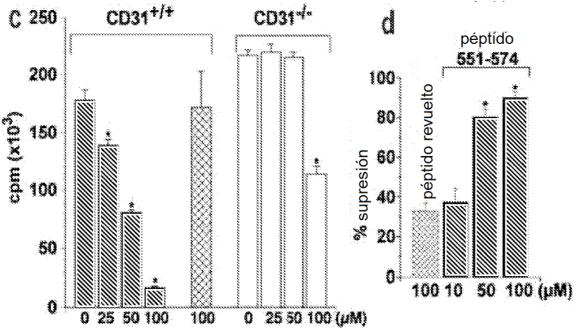
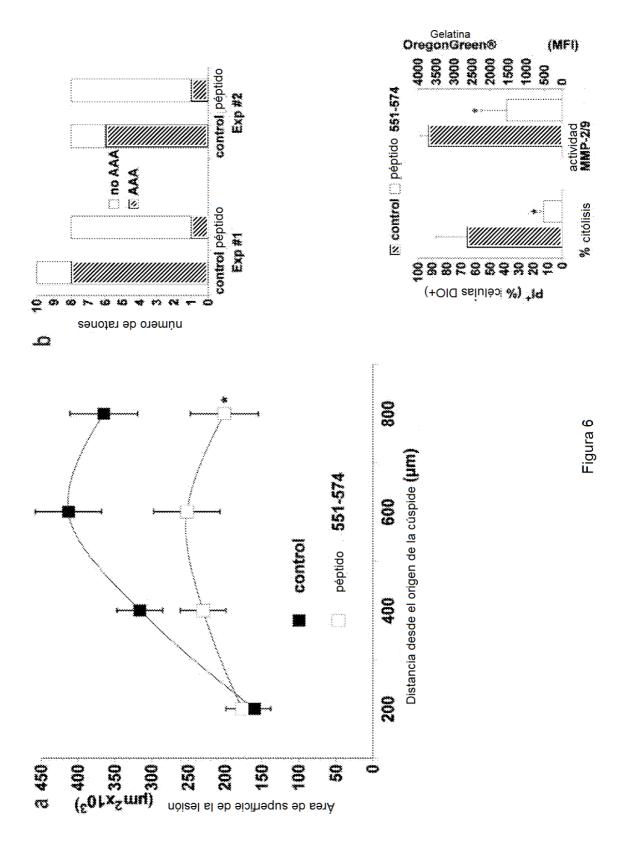


Figura 5



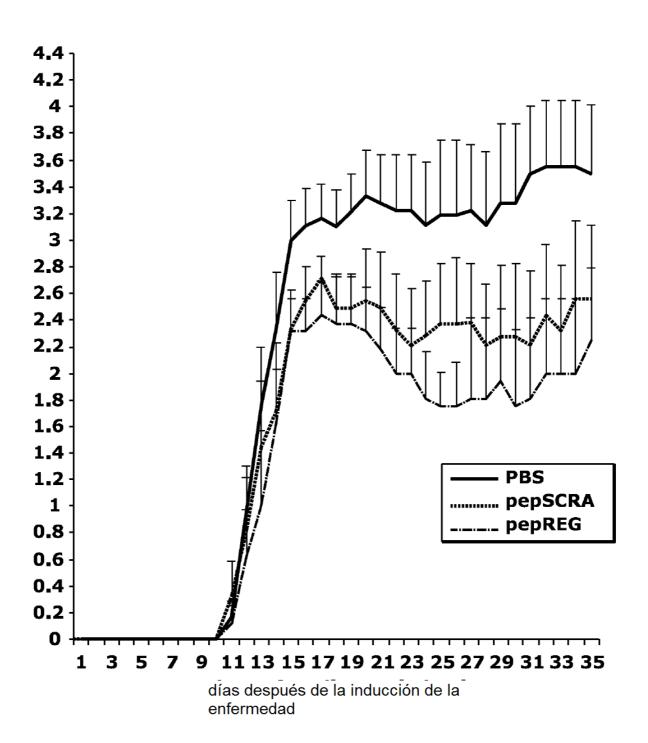


Figura 7